

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFET DES CATÉCHINES DU THÉ VERT SUR LA RÉGULATION DE LA
PÉRIOSTINE: IMPACT SUR L'ACQUISITION DU PHÉNOTYPE
MÉTASTASIQUE DES CELLULES TUMORALES CÉRÉBRALES

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR
IKRAM HANA BENENEMISSI

MAI 2015

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Monsieur le Professeur Borhane Annabi

Je vous remercie vivement pour l'occasion que vous m'avez offerte en acceptant de m'accueillir au sein de votre équipe de recherche et qui m'a permis de saisir de près ce que c'est que les qualités d'un chercheur, pour tout le savoir que vous m'avez transmis humblement depuis le premier jour où j'étais accueillie dans votre laboratoire, où vous m'avez initié et appris les premiers pas en biochimie. Merci aussi pour vos précieux apports, conseils et orientation dans la rédaction scientifique, ainsi que pour votre soutien, patience et indulgence qui ont donné un sens à mes efforts et qui me serviront de leçons tout le long de ma carrière. Veuillez trouver ici, cher maître, l'expression de ma plus profonde gratitude, mon respect et admiration, ainsi que ma reconnaissance éternelle. Sans vous, je n'aurai jamais pu bénéficier d'une telle opportunité de formation.

Monsieur le Professeur Richard Béliveau

Je vous remercie pour tous les efforts que vous déployez pour la collecte des fonds de développement de la recherche pour le bien de l'humanité, et qui permettent également à nous, étudiants, d'apporter notre contribution, aussi petite soit-elle, dans l'avancée de la recherche dans le domaine du traitement des cancers. Je vous remercie également pour vos multiples encouragements et vos précieuses motivations.

Madame Sylvie Lamy, chercheure senior

Je vous remercie pour les efforts immenses fournis par vos soins et qui m'ont guidé au pas-à-pas dans mes recherches, pour votre disponibilité avérée, vos conseils avisés, votre rigueur soulignée ainsi que pour le savoir que vous n'avez cessé de me transmettre tout le long de ma formation.

Mme Julie Poirier: Je vous remercie pour tous les efforts que vous avez fournis pour l'explication des différentes techniques de laboratoire, ainsi que pour votre contribution dans la réalisation de certaines manipulations.

Mme Annie Levert: Je vous remercie pour votre aide et votre contribution dans la réalisation de certaines manipulations, ainsi que pour votre disponibilité.

Mme Sonia Lachance: Pour votre mobilisation pour la facilitation et la prise en charge de nos préoccupations administratives.

À tout le personnel oeuvrant au sein de la Chaire de Recherche en Prévention et Traitement du Cancer, ainsi qu'au Laboratoire d'Oncologie Moléculaire au Département de chimie de l'UQAM, pour votre aide précieuse et votre accueil. Nomément : Dr Khadija Haidara, Alain Zgheib, Amélie Vézina, Amira Ouanouki, Aroua Ben Saad, Bayader Annabi, Clémence Bensiali-Hadaud, Cyndia Charfi, Djahida Djerir, David Beauchemin, Jonathan Pratt, Mustapha Iddir, Pascale Gagné, Samuel Burke-Nanni, et Samuel Sheehy.

Merci au soutien financier de la **Chaire en prévention et traitement du cancer**, la **Fondation de l'UQAM** et du **Programme des Fonds d'accessibilité à la recherche de l'UQAM**.

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail, veuillez trouver ici ma reconnaissance et mon humble remerciement.

DÉDICACES

À mon défunt grand-père...

Qui a impulsé en moi ma première passion pour les études et la recherche.
Qui est, et qui restera pour toujours, mon modèle, mon repère et ma source
d'inspiration.

Pour qui rien n'égale mon respect que mon admiration;

À ma grand-mère ...

Qui a déployé amour et affection pour m'éduquer, m'instruire et me guider
dans la vie;

À mes chères tantes Mouna, Sana, Soumeiya;

À mes parents et à mon frère

À toute ma famille...

Qu'ils puissent trouver dans ce travail, ma gratitude et mon éternelle
reconnaissance.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xii
RESUMÉ.....	xiv

CHAPITRE 1

INTRODUCTION.....	1
1.1 Cancer.....	1
1.1.1 Statistiques.....	1
1.1.2 Cancérogenèse.....	1
1.1.3 Les tumeurs cérébrales : Gliomes.....	5
1.2 Angiogenèse.....	6
1.2.1 Les étapes de l'angiogenèse.....	6
1.3 Périostine.....	8
1.3.1 Identification et localisation.....	8
1.3.2 Gène de la périostine.....	9
1.3.3 Isoformes de la périostine.....	9
1.3.4 Régulation de l'expression de la périostine.....	11
1.3.4.1 Relation périostine versus intégrines.....	11
1.3.5 Rôle de la périostine.....	12
1.3.5.1 Réparation des lésions.....	12
1.3.6 Impact de la relation de la périostine vs MEC.....	13
1.4 Rôle de la périostine dans les étapes clés de la tumorigenèse.....	16
1.4.1 Instabilité génomique.....	17
1.4.2 Immortalisation.....	17
1.4.3 Division cellulaire.....	18
1.4.4 Survie cellulaire.....	18

1.4.5 Angiogenèse.....	19
1.4.6 Métastase.....	19
1.5 Relation entre aliments et cancers.....	21
1.5.1 Effets bénéfiques d'une alimentation saine sur la santé.....	23
1.5.2 Structure chimique des catéchines.....	25
1.5.3 Sources alimentaires des catéchines.....	27
CHAPITRE II	
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS.....	29
2.1 Problématique.....	29
2.2 Hypothèse de travail.....	29
2.3 Objectifs de recherche	30
CHAPITRE III	
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	31
3.1 Matériel.....	31
3.2 Méthodes.....	32
3.2.1 Culture cellulaire.....	32
3.2.2 Test de la viabilité cellulaire mesurée à l'aide du réactif WST-1.....	33
3.2.3 Lyse cellulaire et récolte du milieu de culture conditionné.....	33
3.2.4 Dosage des protéines selon la méthode de microBCA.....	34
3.2.5 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).....	34
3.2.6 Immunodétection des protéines.....	35
3.2.7 Extraction de l'ARN total.....	35
3.2.8 Synthèse d'ADNc et RT-PCR en temps réel.....	36
3.2.9 ARN interférence.....	37
3.2.10 Essai de migration cellulaire en temps réel.....	37
3.2.11 Essai de tubulogenèse sur Matrigel.....	38

CHAPITRE IV	
RESULTATS.....	39
4.1 Expression de la périostine dans différentes lignées cellulaires.....	39
4.2 Concentration du milieu de culture conditionné des cellules U251.....	39
4.3 Effets des catéchine sur l'expression de la périostine au niveau du Compartiment tumoral.....	41
4.3.1 Effet sur la sécrétion de la périostine.....	41
4.3.2 Effet sur l'expression protéique et génique de la périostine.....	41
4.4 Concentration-réponse des catéchines les plus efficaces sur la sécrétion de la périostine.....	45
4.5 Effets des catéchines sur la viabilité cellulaire des cellules U251 et des HBMECs.....	48
4.6 Répression génique transitoire de la périostine: Effet sur l'expression protéique, génique et sur la sécrétion.....	50
4.7 La périostine sécrétée par le compartiment cellulaire tumoral induit la tubulogénèse du compartiment cellulaire endothélial.....	54
4.8 La périostine comme facteur proangiogénique.....	57
4.8.1 Les catéchines inhibent la migration induite par la périostine.....	57
4.9 Effets des catéchines sur la phosphorylation de ERK induite par la Périostine.....	62
CHAPITRE V	
DISCUSSION.....	66
5.1 Expression de la périostine dans différentes lignées cellulaires.....	67
5.2 Effet des catéchines sur l'expression de la périostine au niveau du compartiment tumoral.....	68
5.3 Concentration-réponse des catéchines les plus efficaces sur la sécrétion de la périostine.....	70
5.4 La périostine sécrétée par le compartiment cellulaire tumoral induit la tubulogénèse du compartiment cellulaire endothélial.....	71
5.5 La périostine comme facteur proangiogénique et effets des catéchines sur la migration induite par la périostine.....	72

5.6	Rôle de la périostine dans la phosphorylation de ERK et effets des catéchines sur l'inhibition de cette induction.....	74
CHAPITRE VI		
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	77
6.1	Conclusion.....	77
6.2	Perspectives.....	78
	BIBLIOGRAPHIE.....	79

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Propriétés acquises des cellules tumorales.....	2
1.2 Étapes de la tumorigenèse.....	4
1.3 Étapes de l'angiogenèse tumorale	7
1.4 Schéma représentatif de la séquence protéique de la périostine....	10
1.5 Schéma du rôle de la périostine dans la tumorigenèse.....	16
1.6 Structure chimique des catéchines du thé vert.....	26
4.1 Niveaux de sécrétion et d'expression protéique de la périostine dans différentes lignées cellulaires.....	40
4.2A Effets des différentes catéchines sur l'inhibition de l'expression de la périostine au niveau génique, protéique, et de la sécrétion dans les cellules U251.....	42
4.2(B,C) Effets des différentes catéchines sur l'inhibition de l'expression de la périostine au niveau génique, protéique, et de la sécrétion dans les cellules U251.....	43
4.3 Effet des différentes concentrations de catéchines sur la sécrétion la périostine.....	46
4.4 Effets des catéchines sur la viabilité des cellules U251 et HBMECs.....	49
4.5A Effets des différents ARN-interférents sur l'inhibition de l'expression de la périostine au niveau génique, protéique, et dans la sécrétion dans les cellules U251.....	51
4.5(B,C) Effets des différents ARN-interférents sur l'inhibition de l'expression de la périostine au niveau génique, protéique, et dans la sécrétion dans les cellules U251.....	52
4.6 Effet de la périostine sur la tubulogenèse dans les cellules HBMECs.....	55
4.7(A,B) Impact de la périostine sur la migration des cellules HBMECs et l'effet des catéchines sur l'inhibition de la migration du compartiment endothélial induite par la périostine.....	58

4.7(C,H) Impact de la périostine sur la migration des cellules HBMECs et l'effet des catéchines sur l'inhibition de la migration du compartiment endothélial induite par la périostine.....	60
4.8A Relation entre la périostine et l'induction de la signalisation cellulaire par la voie ERK.....	63
4.8B Relation entre la périostine et l'induction de la signalisation cellulaire par la voie ERK.....	64
4.8C Relation entre la périostine et l'induction de la signalisation cellulaire par la voie ERK.....	65
5.1 Rôle potentiel de la catéchine EGCG sur la périostine.....	76

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
Tableau 1.1 Liste de quelques protéines matricielles interagissant avec la périostine.....	15
Tableau 1.2 Sources alimentaires des catéchines.....	28

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AP-1	<i>Activator Protein 1</i>
ARN-m	Acide ribonucléique messenger
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BRCA-1	<i>Breast cancer 1</i>
Cdk	<i>Cyclin-dependent kinases</i>
CG	Catéchine-3-gallate
DNMT	ADN méthyltransférase
EC	Epicatéchine
ECG	Epicatéchine-3-gallate
EGC	Epigallocatechine
EGCG	Epigallocatechine-3-gallate
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique
EMI	<i>Emilin-like</i>
ErB1	<i>Eukaryotic ribosome biogenesis protein 1</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
Fak	<i>Focal adhesion kinase</i>
Fas-1	<i>Fasciclin-like</i>
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
GC	Gallocatechine
GCG	Gallocatechine-3-gallate
HAT	<i>Histone acetyl transferase</i>
HBMECs	Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines
HDAC	Histone désacétylase
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HMVEC	Cellules endothéliales microvasculaires humaines

hTERT	<i>human telomerase reverse transcriptase</i>
HUVEC	Cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine
IL	Interleukine
JNK	<i>c-Jun N-terminale kinase</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MMPs	Métalloprotéases matricielles
NF- κ B	Facteur nucléaire kappa B
OSF-2	<i>Osteoblast specific factor 2</i>
PDGF	Facteur de croissance dérivé de plaquettes
POSTN	<i>Periostin, Osteoblast Specific Factor</i>
TEM	Transition épithéliomésenchymateuse
TGF- β	Facteur de croissance transformant-beta
TNF	Facteur de nécrose tumoral
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
WCRF	<i>World cancer research fundation</i>
YY-1	Yin Yang-1
(-)-C	Catéchine

RÉSUMÉ

La prévention basée sur une alimentation saine et équilibrée constitue l'une des pistes intéressantes de recherche en cancérologie. En effet, les traitements actuellement disponibles sont encore peu efficaces et associés à des effets secondaires délétères, raison pour laquelle, plusieurs études s'articulent actuellement sur l'intervention en amont, bien avant l'installation de la maladie. Parmi les aliments qui font l'objet de recherches, les catéchines, composants phytochimiques retrouvés principalement dans le thé vert, sont particulièrement intéressantes du fait de leur grand potentiel inhibiteur de la cancérogenèse. Cependant, leur action précise sur la périostine, une protéine de la matrice extracellulaire incriminée récemment dans la métastase, n'a jamais été auparavant étudiée.

L'objectif de notre recherche est donc de préciser, en premier lieu dans les glioblastomes, le niveau d'expression intracellulaire et extracellulaire de la périostine, dont la surexpression est corrélée en particulier à l'angiogenèse et à l'induction de métastases dans différents cancers. D'autres objectifs ont aussi été fixés notamment de déterminer la spécificité d'action des catéchines, sur le niveau de sécrétion, sur l'expression génique et protéique de la périostine, ainsi que leur impact sur les aspects cellulaires induits par la périostine sécrétée par le compartiment tumoral. Les cellules de glioblastomes U251 ont été traitées avec les différentes catéchines du thé vert ou avec de petits ARN interférants (siRNA), et les niveaux d'expression génique et protéique de la périostine ont été par la suite analysés par qRT-PCR et immunobuvardage. La tubulogenèse des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales (HBMECs) sur Matrigel a été analysée en présence des différents milieux de culture conditionnés par les cellules U251 traitées par les siRNA ou les catéchines. La migration des HBMECs induite par la périostine a été mesurée par xCELLigence.

Seule la lignée U251 exprimait la périostine au niveau intracellulaire et extracellulaire. Parmi les catéchines testées pour évaluer leur impact sur la régulation de la périostine, seule la GCG provoquait une inhibition au niveau de la tubulogenèse, alors qu'au niveau de la migration cellulaire, les catéchines EGC, GC, GCG et EGCG semblent être responsables de l'inhibition de la migration stimulée par la périostine. Au niveau moléculaire, les milieux de culture conditionnés prétraités avec les différentes catéchines CG, GC, GCG, ECG, EGC, EGCG, étaient responsables d'une diminution de la phosphorylation de ERK du compartiment endothélial. De ce fait, les catéchines du thé vert peuvent servir comme stratégie de prévention contre le cancer du cerveau et cela, en inhibant la transcription, l'expression protéique intracellulaire et extracellulaire de la périostine, ainsi que l'angiogenèse et la voie de signalisation induites par la périostine.

MOTS CLÉS: Cancer, Glioblastome, Angiogenèse, Périostine, Catéchines, Thé vert.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Cancer

1.1.1 Statistiques

Le cancer est devenu la maladie du siècle en représentant l'une des principales causes de mortalité et de morbidité dans le monde. En 2012, l'Organisation Mondiale de la Santé a dénombré 14 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès liés à la maladie de par le monde (Source OMS). Au Canada en 2014, et selon les statistiques de la société canadienne du cancer, environ deux personnes sur cinq seront atteintes de cette maladie au cours de leur vie, et une sur quatre en mourra. L'estimation, selon la même source statistique, avance le nombre de 191 300 nouveaux cas de cancers et 76 600 décès causés par cette maladie pour l'année 2014. Durant cette année, 9 canadiens mourront chaque heure. Parmi les nouveaux cas, 24% des décès seront attribuables au cancer de la prostate chez l'homme, 26% au cancer du sein chez la femme, 14% au cancer du poumon et 13% au cancer colorectal. Le cancer du système nerveux central représentera respectivement 2,2% et 2,9% des causes de décès par cancer chez les femmes et les hommes canadiens (Société Canadienne du Cancer, 2014).

1.1.2 Cancérogenèse

La transformation maligne d'une cellule normale en cellule cancéreuse est la résultante de plusieurs altérations génétiques et épigénétiques lui permettant

d'acquérir plusieurs caractéristiques. Les cellules cancéreuses pourront, de ce fait, développer une résistance à l'inhibition de la division cellulaire en absence de facteurs de croissance, se répliquer de manière illimitée, échapper à l'apoptose, envahir les tissus avoisinant et stimuler le développement de néovaisseaux (Hanahan 2000) (Figure 1.1).

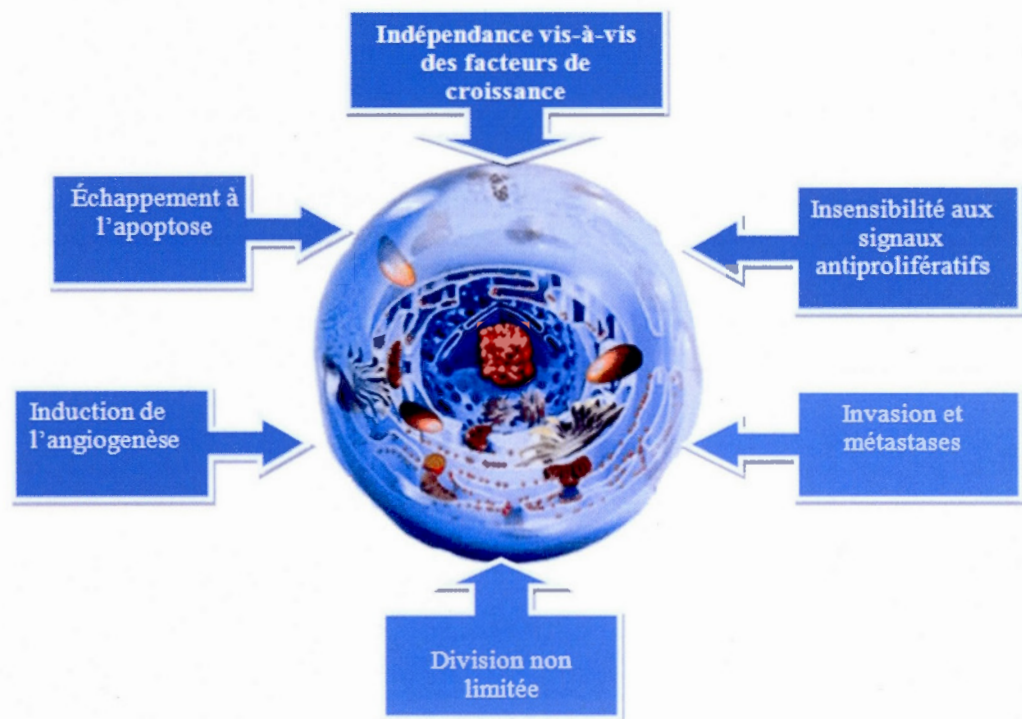


Figure 1.1 Propriétés acquises des cellules tumorales (Hanahan et Weinberg, 2000).

Les cellules cancéreuses acquièrent plusieurs caractéristiques: développement d'une résistance à l'inhibition de la division en absence de facteurs de croissance, division non limitée, insensibilité aux signaux antiprolifératifs, échappement à l'apoptose, envahissement des tissus de voisinage et induction de l'angiogenèse et métastase.

La cancérogenèse est un processus multi étapes comprenant trois phases cruciales: l'initiation, la promotion et la progression tumorale (Figure 1.2). Ces phases sont de durée variable (Béliveau et Gingras 2007). La première étape est déclenchée sous l'action de plusieurs agents et facteurs cancérigènes déterminants. Parmi ces facteurs, citons les agents inflammatoires qui ont été évoqués pour la première fois par Rudolf Virchow en 1863 (Balkwill et Mantovani, 2001). Cette hypothèse de lien entre le cancer et l'inflammation est actuellement largement documentée, puisque 15% des cancers chez l'homme sont initiés à partir de sites d'infection ou d'inflammation chronique (Kuper *et al.*, 2000; Al-Zhoughbi *et al.*, 2014). Les facteurs inflammatoires incriminés sont nombreux dont l'interleukine-1 β et la prostaglandine E₂ (Jung *et al.*, 2003). Les autres facteurs incriminés dans l'initiation de la cancérogenèse sont certains promoteurs tumoraux (esters de phorbol et acide okadaïque), les agents inflammatoires (facteur de nécrose tumorale (TNF), peroxyde d'hydrogène), mais également les facteurs environnementaux tels que la fumée du tabac (Aggarwal *et al.*, 2006). En effet, ces éléments induisent plusieurs changements notamment au niveau des facteurs de transcription dont le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B), les protéines anti/ pro-apoptotiques, les protéines kinases, le récepteur de croissance épidermique (EGFR), le récepteur du facteur épidermique humain (HER2), la kinase c-jun N-terminale (JNK), les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK), les protéines des cycles cellulaires (cyclines et Cdk), les molécules d'adhésion cellulaire ainsi que les voies de signalisation induites par les facteurs de croissance (Aggarwal *et Shishodia*, 2006).

Le maintien de l'intégrité et de la stabilité génomique sont deux éléments importants pour les cellules qui subissent du stress et des dommages en continu à leur ADN (Aguilera et Gomez-Gonzalez 2008). En effet, les défauts des mécanismes de réparation de l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire vont conférer une plus grande instabilité génétique et une prédisposition au cancer (Elledge, 1996). Ce déséquilibre génomique constitue donc l'une des conséquences de la première étape

susmentionnée de la cancérogenèse qui met la cellule devant deux éventualités: une mort cellulaire par les mécanismes d'autodestruction, où si ces derniers sont altérés la cellule induit la deuxième phase, soit la promotion (Hussain *et al.*, 2003). Cette phase est caractérisée par une série d'altérations cellulaires dont quelques-unes ont été déjà citées (résistance à l'inhibition de la multiplication en absence de facteurs de croissance, la réplication non limitée et l'échappement à l'apoptose). Au final, c'est au niveau de la dernière phase que la tumeur acquiert ses caractéristiques angiogéniques et/ou métastatiques permettant ainsi l'invasion d'autres tissus et d'autres organes.

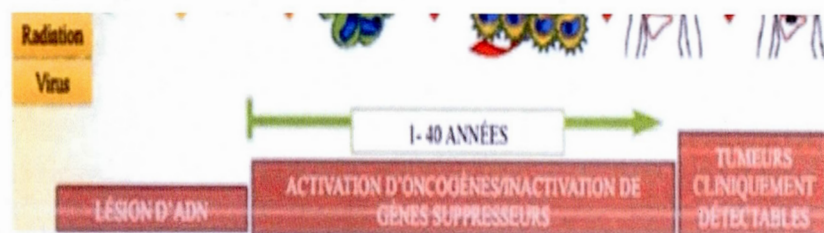


Figure 1.2 Étapes de la tumorigenèse. (Béliveau et Gingras, 2007). La cancérogenèse, est un processus multi étapes comprenant trois phases cruciales: l'initiation, la promotion et la progression tumorale. Ces phases sont de durées variables. La première étape est déclenchée sous l'action d'agents cancérogènes, la deuxième est caractérisée par l'activation d'oncogènes et la suppression de supresseurs de tumeurs. Enfin, c'est à partir de la dernière étape que les tumeurs deviennent détectables. (Béliveau et Gingras, 2007).

1.1.3 Les tumeurs cérébrales: Gliomes

Les gliomes ou tumeurs gliales sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes chez l'adulte. Elles sont développées à partir des cellules spécialisées qui constituent le cerveau, en l'occurrence les cellules gliales, les astrocytes et les oligodendrocytes. Ces tumeurs, à croissance lente, se développent généralement insidieusement durant des mois, voire des années, contrairement aux lésions vasculaires qui s'installent brutalement.

Les gliomes sont classés selon l'organisation mondiale de la santé selon les phénotypes des cellules tumorales (astrocytaires, oligodendrocytaires, ou mixte) et le grade de malignité (du grade I au grade IV). Ce dernier paramètre prend en compte la densité cellulaire, la présence de nécrose, de néovaisseaux, mitoses et atypies cellulaires. Huit principaux types de gliomes sont donc individualisés: astrocytome de grade I à IV (astrocytome grade IV est aussi appelé glioblastome et constitue la forme la plus fréquente des gliomes), oligodendrogliomes de grade II et III, les oligoastrocytomes ou gliomes mixtes de grade II et III (Louis DN *et al*, 2007).

L'originalité de ces tumeurs gliales, de mauvais pronostic, réside dans le fait qu'elles se développent au niveau du cerveau, organe hautement fragile, doté d'un environnement immunologique privilégié et muni d'une barrière hémato-céphalique le rendant peu accessible aux agents administrés par voie générale, d'où la difficulté du traitement de ce type de tumeurs. En outre, les tumeurs gliales ont une très grande capacité à infiltrer le tissu cérébral avoisinant à de très grandes distances allant jusqu'à plusieurs centimètres de la masse principale, et d'autre part, développent des mécanismes de résistance à la radiothérapie et à la chimiothérapie (Behin *et al.*, 2003).

1.2 Angiogenèse

L'angiogenèse est le processus qui permet de créer, à partir de réseaux vasculaires préexistants, de nouveaux vaisseaux sanguins (Folkman, 1995). L'angiogenèse perd ses caractéristiques physiologiques, conduisant ainsi à une transformation pathologique, voire même tumorale, suite à un déséquilibre entre signaux d'activation et signaux d'inhibition (Munoz-Chapuli, 2011). Ce déséquilibre est contrôlé par des signaux proangiogéniques (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, FGF-a, FGF-b et autres), et des signaux antiangiogéniques (interferon α/β , angiotensine et endostatine, et autres) (Weinberg, 2007, Mittal *et al.*, 2014). Dans le cas du cancer, le déséquilibre de l'angiogenèse est responsable de la vascularisation tumorale (Bergers *et* Benjamin, 2003). Celle-ci permet l'approvisionnement des cellules tumorales en nutriments et en oxygène (Folkman 2006). En outre, notons que l'architecture vasculaire tumorale diffère de celle qui est normale tant au niveau structurel que fonctionnel (Bergers *et* Benjamin, 2003).

1.2.1 Les étapes de l'angiogenèse

L'état actif caractérisant la conversion des cellules endothéliales se manifeste via plusieurs processus à la fois distincts et interdépendants (Figure 1.3). En premier lieu, on assiste à une stimulation de ces cellules par divers facteurs angiogéniques, dont les plus documentés sont le bFGF (basic fibroblast growth factor) et le VEGF (vascular endothelial growth factor), qui sont directement sécrétés par les cellules tumorales suite à l'activation par certains oncogènes ou en réponse à des conditions d'hypoxie. Ces facteurs peuvent être également sécrétés indirectement suite à la stimulation de cellules inflammatoires ou soit par les facteurs mitogéniques et les enzymes protéolytiques tels les activateurs tissulaires du plasminogène (tPA). Les étapes de l'angiogenèse vont alors se succéder: la pénétration de la membrane basale de la matrice extracellulaire séparant les cellules endothéliales du tissu sous-jacent, la

migration vers la source du stimulus angiogénique des cellules endothéliales, la formation de nouveaux vaisseaux suite à la prolifération des cellules endothéliales; en fin la formation d'un réseau de capillaires et le remodelage du tissu cellulaire grâce à la sécrétion de composants de la membrane basale qui y contribuent (Béliveau et Gingras, 2007).

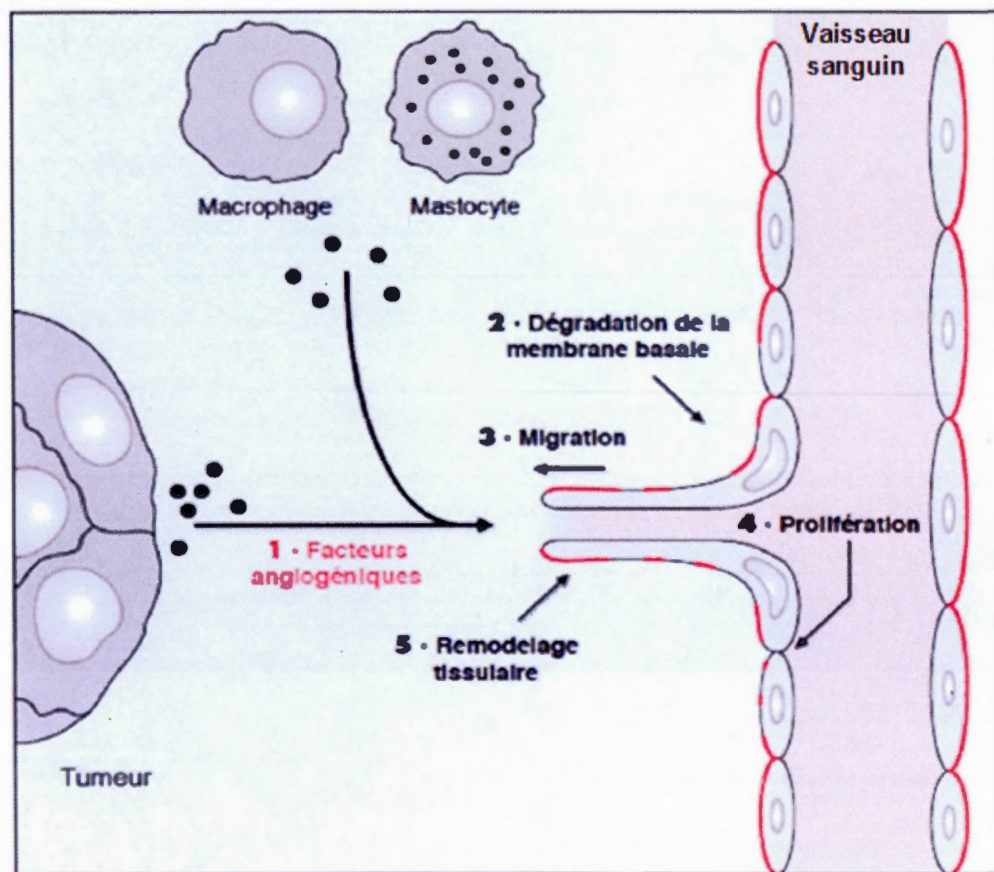


Figure 1.3 Étapes de l'angiogenèse tumorales (Gingras et Béliveau, 1997). Le compartiment tumoral ou les macrophages/mastocytes, sont responsables de l'initiation de l'angiogenèse. Induisant ainsi au niveau du compartiment endothélial, une dégradation de la membrane basale, de la migration cellulaire et du remodelage tissulaire.

1.3 Périostine

1.3.1 Identification et localisation

Chez l'espèce humaine, le gène de la périostine se localise au locus 13q13.3, et il fut nommé, lors de sa découverte, Osteoblast Specific Factor 2 (OSF-2) (Takeshita *et al.*, 1993). Ce n'est qu'en 1999, et suite aux travaux de l'équipe du Dr Horiuchi montrant la présence d'une importante immunoréactivité au niveau du périoste, membrane couvrant les os longs et plats, que son nom changea en périostine (POSTN: Periostin, Osteoblast Specific Factor), éliminant ainsi toute confusion avec le facteur de transcription Runx2/cbfa1, nommé également OSF-2 (Horiuchi *et al.*, 1999).

En outre, les premières études sur cette protéine ont permis de déterminer d'une manière générale, sa localisation dans l'organisme mais également qu'elle est plus exprimée chez l'embryon que chez l'adulte. C'est le cas chez l'embryon de souris, où elle est localisée dans plusieurs organes en développement ainsi qu'au niveau du cœur et du système ostéoarticulaire (Litvin *et al.*, 2004; Rios *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2008; Conway *et al.*, 2014; kashima *et al.*, 2009). Chez l'adulte (espèce humaine et murine), son expression se limite à des régions spécifiques telles le ligament parodontal (Horiuchi *et al.*, 1999; Conway *et al.*, 2014), les valves atrio-ventriculaires (Lindsley *et al.*, 2005), ainsi qu'au niveau du périoste (Horiuchi *et al.*, 1999; Conway *et al.*, 2014). Par ailleurs, et en plus de son expression dans les ostéoblastes, la périostine semble jouer un rôle important dans les phases précoces de l'ostéogenèse, et son expression disparaît lors de la maturation de l'ostéoblaste (Coutu *et al.*, 2008).

1.3.2 Gène de la périostine

Le cadre de lecture ouvert du gène de la périostine contient 23 exons dont 2 ou 3, respectivement chez l'espèce humaine et murine, peuvent être assujettis à un épissage alternatif de l'ARN-m résultant soit en une substitution soit en une délétion. En revanche, chez la souris la séquence promotrice contient plusieurs éléments de régulation transcriptionnelle potentiels dont les plus connus sont: Yin Yang-1 et une E-box (Lindsley *et al.*, 2007; Oshima *et al.*, 2002). Certains rôles de ces séquences régulatrices ont été étudiés dans le but de mieux connaître le mode de fonctionnement de la périostine, et il a été observé que quelques-unes semblent avoir des effets sur les mécanismes tumoraux. Ainsi, l'équipe du Dr Oshima et de ses collaborateurs démontra l'implication de la E-box (Oshima *et al.*, 2002) dans la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), un processus impliqué dans la progression tumorale. De même l'équipe du Dr Wang valida l'implication du facteur de transcription Yin Yang-1 à la fois sur l'inhibition de la cancérogenèse que celle du cycle cellulaire (Wang *et al.*, 2006).

1.3.3 Isoformes de la périostine

Chez l'espèce humaine, la masse moléculaire du précurseur de la périostine avant son épissage est d'environ 93kDa. En effet, le domaine N-terminal de la protéine est constitué d'une séquence signal qui est déléetée après sa sécrétion, suivie d'une séquence riche en cystéine EMI (Emilin-like), et par quatre domaines Fas-1 (fasciclin1-like) fortement liés à la séquence d'acides aminés du gène ancestral fascicline chez la drosophile, dont deux sont plus conservés que les deux autres. Ces domaines sont caractérisés par un site de glycosylation et un domaine C-terminal variable (Takeshita *et al.*, 1993; Horiuchi *et al.*, 1999) (Figure 1.4). De plus, la périostine est une protéine de la famille des Gla-protéines du fait que la première séquence Fas-1 est reconnue par la γ -glutamyl carboxylase (Coutu *et al.*, 2008).

D'autre part, la deuxième séquence Fas-1, démontrant une forte homologie avec les protéines de la famille Big-h3, est un domaine d'interaction avec les intégrines (Kim *et al.*, 2002).

Par ailleurs, les isoformes de la périostine sont au nombre de 8 chez l'espèce humaine (Bai *et al.*, 2010). Cependant, les fonctions spécifiques des différents isoformes ne sont pas connues. En effet, plusieurs études ont démontré que certains facteurs pouvaient avoir un effet sur l'expression différentielle de ces derniers. Ainsi, chez la souris une différence d'expression est observée au cours du développement (Kruzynska-Frejtag *et al.*, 2004) ou suite à un stress biologique (Shimazaki *et al.*, 2008). Il a été également démontré dans les travaux de Kim et de ses collaborateurs que, chez l'humain, les formes natives de la périostine ne sont plus exprimées chez les patients atteints de tumeur de la vessie (Kim *et al.*, 2008).

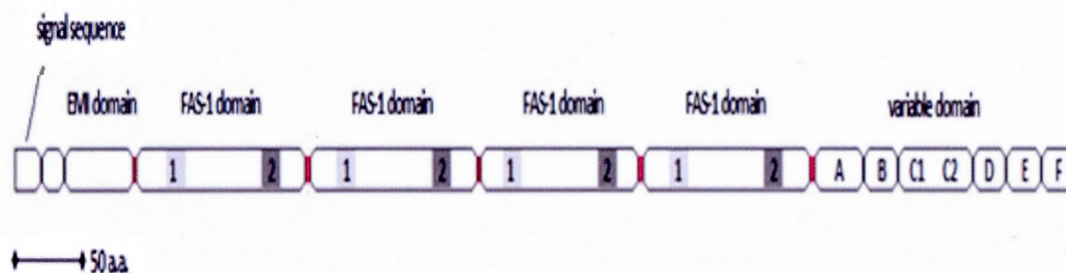


Figure 1.4 Schéma représentatif de la séquence protéique de la périostine. Le domaine N-terminal de la protéine est constitué d'une séquence signal qui est délétée après sa sécrétion, suivie d'une séquence riche en cystéine: EMI (Emilin-like), et par quatre domaines Fas-1 (fasciclin1-like) dont deux sont plus conservés que les deux autres. Ces domaines sont caractérisés par un site de glycosylation et un domaine C terminal variable.

1.3.4 Régulation de l'expression de la périostine

Plusieurs travaux ont démontré la présence de facteurs modifiant l'expression de la périostine. En effet, l'expression de la périostine est modulée par le TGF- β (Horiuchi *et al.*, 1999), BMP-2 (Hwang *et al.*, 2014) et le facteur de transcription Twist (Oshima *et al.*, 2002). Il a été également démontré que la sécrétion de la périostine peut être modifiée par le PDGF-(aa, bb) et le FGF-(A, B) dans les cellules stellaires pancréatiques (Erkan *et al.*, 2007; cité dans la revue Sirica *et al.*, 2014), le Wnt-3 dans les cellules épithéliales mammaires (Haertel-Wiesmann *et al.*, 2000), les IL-4 et IL-13 dans les fibroblastes pulmonaires (Takayama *et al.*, 2006), et le FGF-1 et Angiotensine II, en conditions hypoxiques, dans les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires par modification des voies MAPK (Li *et al.*, 2004). De plus, la périostine semble être modifiée aussi par l'action du stress mécanique dans les ligaments alvéolo-dentaire (Wilde *et al.*, 2003; Afanador *et al.*, 2005), ainsi que dans les tumeurs du poumon (Ma *et al.*, 2009).

1.3.4.1 Relation périostine versus intégrines

Plusieurs études ont confirmé l'importance de la liaison de la périostine avec plusieurs protéines matricielles. Entre autres, la périostine interagirait avec certaines intégrines $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$, $\alpha 6 \beta 4$ (Ruan *et al.*, 2009), jouant ainsi un rôle dans la cancérogenèse. Au niveau du cancer des ovaires, les hétérodimères $\alpha v \beta 3$ et $\alpha v \beta 5$ seraient à l'origine de la régulation de la migration et de l'adhésion cellulaire (Gillan *et al.*, 2002). De plus, l'activité proangiogénique de la périostine est liée à l'activation de la voie $\alpha v \beta 3$ /Fak (Focal Adhesion Kinase) (Shao *et al.*, 2004). Yan et Shao ont également rapporté l'existence d'une étroite relation entre $\alpha v \beta 3$ et l'induction de la TEM et cela suite à l'interaction entre ces intégrines et le récepteur EGFR/HER1/ErB1, activant ainsi l'invasion et finalement la métastase *in vivo* (Yan

et Shao, 2006). En outre, $\alpha 6\beta 4$ serait le récepteur de la périostine dans les tumeurs pancréatiques.

1.3.5 Rôle de la périostine

La MEC est en partie responsable de la transmission des signaux entre les cellules permettant un bon maintien de la structure ainsi que de la fonction du tissu conjonctif (Berrier et Yamada, 2007). Elle est composée de protéines structurales telles que la fibronectine, le collagène, la laminine, des protéines spécialisées (les peptidoglycanes et protéoglycanes), ou alors des facteurs de croissance et de métalloprotéinases (Stamenkovic, 2003; Tayebjee 2003). En 2008, la périostine fut classée en tant que protéine de la MEC et cela en se basant sur ses différents rôles au niveau du développement du système cardiaque chez la souris (Norris *et al.*, 2008).

La périostine est surexprimée dans les pathologies fibrotiques telles que les fibroses de l'asthme, ainsi que celles de la moelle osseuse (Takayama *et al.*, 2006 cité dans la revue de Kudo, 2011; Oku *et al.*, 2008). Par ailleurs, les études pionnières sur la périostine ne concernaient que son niveau d'expression tissulaire physiologique ainsi que pathologique. Ce n'est qu'en 2005, que son implication commença à être évoquée au niveau du développement et de la réparation de lésions dans différentes pathologies (Rio *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'expression la plus importante de la périostine chez la souris se situe au niveau des tissus conjonctifs riches en collagène et sa délétion induit un retard de croissance, confirmant ainsi son importance dans le développement postnatal (Rios *et al.*, 2005).

1.3.5.1 Réparation des lésions

La réparation de lésions est un processus multi phases faisant interagir plusieurs protéines dont certaines jouent le rôle d'un support structurel, tel est le cas

pour la fibrine ainsi que le collagène et la fibronectine. Dans le tissu osseux, plusieurs autres protéines matricielles permettent la transmission de signaux spécifiques entre les cellules du tissu réparé, assurant ainsi un changement du phénotype des cellules osseuses tel que la promotion de l'adhésion, la fonction et la différenciation des ostéoblastes et des ostéoclastes (Alford *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'expression de la périostine dans ces mécanismes de réparation a été détectée au niveau du système vasculaire cardiaque (Norris *et al.*, 2008), des lésions dermiques chroniques (Roy *et al.*, 2007), musculaires (Goetsch *et al.*, 2003) et osseuses (Zhu *et al.*, 2009). Il semble également que la périostine soit surexprimée lors des fractures osseuses au niveau du préosteoblaste, du périoste et des cellules mésenchymateuses indifférenciées (Nakazawa *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2009).

Enfin, tout comme les protéines de la MEC, la périostine semble aussi jouer un rôle important dans certaines pathologies et plus précisément, dans le remodelage tissulaire. À ce jour, plusieurs équipes ont caractérisé son interaction avec les intégrines modulant ainsi plusieurs processus cellulaires telles les interactions cellule-matrice, l'adhésion et la prolifération, et finalement dans les processus de différenciation, de survie et de motilité cellulaire (Kudo *et al.*, 2007 cité dans la revue Sirica *et al.*, 2014).

1.3.6 Impact de la relation de la périostine vs MEC

Plusieurs études ont montré l'existence d'une étroite relation entre la périostine et certaines molécules de la MEC (tableau 1.1). Cependant, plusieurs questions restent en cours de débat concernant l'impact de cette interaction sur l'organisation de la MEC. Rappelons que les fibrilles du collagène assurent l'élasticité et la résistance aux tensions mécaniques des tissus conjonctifs (os, tendons, peau, ligaments, cartilage) (Culav *et al.*, 1999). Suite aux études effectuées par Borg et ses collaborateurs, la périostine pourrait avoir un rôle dans les

fibrillogenèses du collagène du fait de sa présence dans les tissus riches en collagène (Borg et Markwald, 2007). Dans une autre étude analysant le tissu conjonctif chez les souris knockouts du gène de la périostine, des altérations de la fibrillogenèse ont été identifiées avec une réduction du diamètre des fibrilles du collagène et une disparition des propriétés biomécaniques du tissu conjonctif fibreux. Ces données avaient démontré que la périostine peut réguler la fibrillogenèse du collagène I et servir de médiateur important des propriétés viscoélastiques de tissus conjonctifs fibreux (Norris *et al.*, 2007).

Protéines	Références	Méthode de mesure	Implication Dans la matrice (selon l'étude référencée)
Périostine	Takayama <i>et al.</i> , 2006	Binding	Sécrétée par les fibroblastes et contribue à la fibrose en se liant aux protéines de la MEC: fibronectine, collagène V, tenascine –C et la périostine elle-même.
Collagène de type I/ V	Norris <i>et al.</i> , 2007	Immuno-fluorescence	Médiateur de la maturation valvulaire: promotion de la différenciation mésenchymateuse en fibroblaste et blocage des formes intermédiaires (myocyte)
Héparine	Sugiura <i>et al.</i> , 1995	Binding+ immunoblotting	rmOSF-2 était capable de se lier à l'héparine ce qui suggère que OSF-2 peut être associée à la MEC osseuse après sécrétion par les ostéoblastes et de participer à l'adhérence cellulaire
Fibronectine	Takayama <i>et al.</i> , 2006	Binding	La périostine sécrétée par les fibroblastes contribue à la fibrose en se liant à la fibronectine,
Tenascine-C	Takayama <i>et al.</i> , 2006	Binding	La périostine sécrétée par les fibroblastes contribue à la fibrose en se liant aux à la tenascine –C

Tableau 1.1 Liste de quelques protéines matricielles interagissant avec la périostine.

MEC: matrice extracellulaire

OSF-2: Osteoblast-specific factor 2, ancienne appellation de la périostine

1.4 Rôle de la périostine dans les étapes clés de la tumorigenèse

Plusieurs études ont démontré l'implication de la périostine dans les processus tumoraux notamment l'instabilité génomique, l'immortalisation, la division non limitée, la survie cellulaire, l'invasion et enfin l'angiogenèse et la métastase. Ces processus font partie des caractéristiques des cellules tumorales (Figure 1.5).

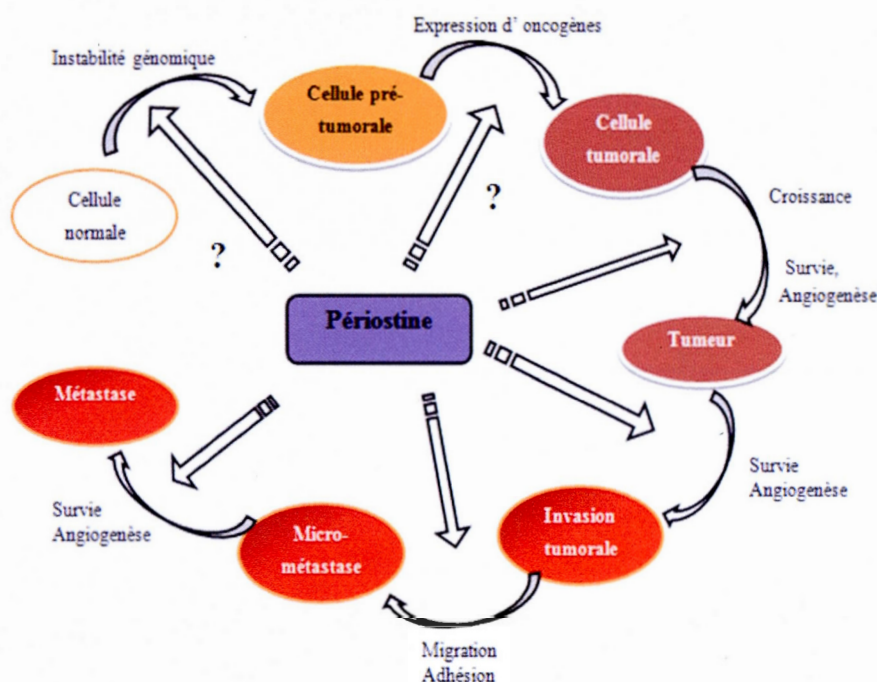


Figure 1.5 Schéma du rôle possible de la périostine dans la tumorigenèse. On souligne la surexpression de la périostine dans plusieurs cancers. Ses interactions avec les intégrines induisent différents événements cellulaires et son implication dans le processus tumoral est démontrée, au niveau d'invasion et de métastase (Li *et al.*, 2007, Kudo *et al.*, 2006) mais également en prévenant l'apoptose (Erkan *et al.*, 2007) et induisant l'angiogenèse (Shao *et al.*, 2004). Quand au rôle de la périostine dans l'instabilité génomique (Quaresima *et al.* 2008), l'immortalisation (Shao *et al.*, 2004), et la prolifération tumorale (Tai *et al.*, 2005), évoqué par certaines études, mérite d'être confirmé par d'autres.

1.4.1 Instabilité génomique

La génomique, étude du fonctionnement des génomes dans leur intégralité, a permis d'identifier l'abondance des séquences répétées non codantes représentant environ 99% de notre génome. Ces séquences sont probablement à l'origine de notre évolution, car elles créent une certaine instabilité de notre génome responsable des translocations, et plus largement des mutations et des polymorphismes. Par ailleurs, L'ADN de nos cellules n'est pas composé d'une structure figée. Il est soumis en permanence à des « stress génotoxiques », spontanés ou induits par l'environnement ou les thérapeutiques, qui modifient la constitution et la forme de la double hélice. Plusieurs mécanismes moléculaires permettent à la cellule de réparer ces dommages. D'autres ont été conservés dans le but de seulement les tolérer, au prix souvent de mutations. Le maintien de la structure du génome s'effectue donc à partir d'un équilibre entre processus de réparation « fidèles » et « mutagènes ». Il faut souligner l'importance de cet équilibre dans la protection des cellules somatiques contre la transformation tumorale et le rôle moteur d'une perte de cet équilibre dans la cancérogenèse. Ainsi donc, un dysfonctionnement des mécanismes de réparation de l'ADN et/ ou du contrôle du cycle cellulaire induit une instabilité génomique et une prédisposition aux différents cancers (Cazaux 2010). Dans le cas de la périostine, une étude avait démontré la présence d'une corrélation positive entre son expression et l'existence de la délétion 5083del19 sur le gène BRCA-1 dans les tumeurs mammaires (Quaresima *et al.*, 2008). Rappelons que le BRCA-1 est un gène suppresseur de tumeur agissant sur le contrôle cellulaire, la recombinaison homologue et la réparation de l'ADN (Venkitaraman 2002).

1.4.2 Immortalisation

Il a été démontré que la présence de la périostine dans les cellules transfectées avec l'oncogène hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase), empêche la

sénescence des cellules immortalisées HMVEC (human microvascular endothelial cells), connues pour leurs rôles importants dans la formation de néovaisseaux sanguins. À noter que, les cellules primaires HMVEC se développent en culture avec un nombre limité de passage avant d'acquérir le phénotype de sénescence d'où l'intégration des hTERT (paramètre déterminant dans l'activation de la telomerase et donc dans l'immortalisation cellulaire) permettant ainsi de prolonger la vie de ces cellules sans toutefois avoir d'effet sur la prolifération et la migration. (Shao *et al.*, 2004). Cependant, aucune étude n'a démontré que la surexpression de la périostine était suffisante pour causer la sénescence, de même, on ne connaît pas, jusqu'à ce jour, l'implication exacte de la périostine dans la prévention de ce processus.

1.4.3 Division cellulaire

Il a été démontré que la périostine stimulait la prolifération cellulaire dans le cancer colorectal (Tai *et al.*, 2005). En revanche, les études menées par l'équipe du Dr Kudo et de ses collaborateurs ont démontré le contraire de ces résultats pour les cellules du laryngopharynx, tout en soulignant que la surexpression de la périostine favorisait l'invasion et l'adhésion *in vitro* dans les mêmes types cellulaires (kudo *et al.*, 2006). Par ailleurs, aucun effet sur la prolifération n'a été observé dans le cas des cancers mammaires, rénaux et mélanomes, mais il a été plutôt observé que la périostine était responsable de l'induction de l'angiogenèse en xénogreffe dans ces mêmes tumeurs (Shao *et al.*, 2004; cité dans la revue Ruan *et al.*, 2009).

1.4.4 Survie cellulaire

Les travaux de Bao et de ses collaborateurs ont démontré l'implication de la périostine dans la progression métastatique des tumeurs colorectales, et cela en assurant la survie des cellules tumorales et endothéliales dans différentes conditions de stress hypoxiques et nutritionnels (Bao *et al.*, 2004). De même, dans les tumeurs

pancréatiques, la périostine prévient la formation de l'apoptose et assure la croissance des cellules tumorales (Erkan *et al.*, 2007). Cette propriété antiapoptotique pourrait être un élément important dans le déchiffrement de l'implication de la périostine dans la progression tumorale.

1.4.5 Angiogenèse

La progression tumorale nécessite l'apport en nutriments et en oxygène, et cela n'est assuré que par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Ce processus se nomme l'angiogenèse (Hanahan *et al.*, 2000) et nécessite l'implication de plusieurs molécules dont la plus connue est le VEGF (Yancopoulos *et al.*, 2000). La périostine se rajoute à cette liste en 2004 (Shao *et al.*, 2004). En effet, la surexpression de la périostine dans les cancers mammaires est corrélée positivement avec l'angiogenèse et cela en stimulant, dans le compartiment endothélial, la voie de transduction $\alpha v\beta 3$ /Fak (Shao *et al.*, 2004; cité dans la revue de Conway *et al.*, 2014).

1.4.6 Métastase

Les métastases sont les phases finales du développement tumoral caractérisées aussi bien par l'intra que l'extravasation, mais également par le maintien de la prolifération et de la réactivation de l'angiogenèse. Aboutissant ainsi à la formation de nouveaux foyers métastatiques (Yilmaz *et al.*, 2007). Plusieurs données de la littérature ont cité le rôle de la périostine dans ces processus, et ce dans plusieurs types de cancers. En effet, il semble que dans les mélanomes non métastatiques, le niveau d'expression de la périostine est basale, correspondant ainsi à son niveau dans les tissus sains. En outre, dans certains cancers métastatiques, ce niveau est supérieur au niveau basal: lymphomes et cancers gastriques (Li *et al.*, 2007), carcinome de la tête et du cou à cellules squameuses (Kudo *et al.*, 2006). Ceci implique ainsi une

corrélation entre la surexpression de la périostine et l'induction des métastases dans différents cancers.

Dans les tumeurs rénales (Yan *et al.*, 2006) ainsi que dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules (Soltermann *et al.*, 2008), d'autres corrélations positives viendraient s'ajouter entre la surexpression de la périostine et d'une part, la progression clinique du cancer (neuroblastomes) (Sasaki *et al.*, 2002), et d'autre part, l'induction de la TEM qui est une étape importante dans la progression de la métastase. En revanche, et contrairement à toutes les études qui démontrent la corrélation positive entre l'expression de la périostine et l'induction des métastases dans plusieurs types de cancers, Kim et ses collaborateurs, ont constaté l'absence de cette corrélation dans le cancer de la vessie. La périostine agirait dans ce type de cancer comme un suppresseur de métastases (Kim *et al.*, 2008).

Il faut toutefois noter que les approches thérapeutiques anticancéreuses disponibles ont prouvé non seulement leurs limites d'action, mais sont surtout accompagnées d'effets secondaires gravissimes. Parmi ces effets citons: une toxicité hématologique (pancytopénie), rénale (insuffisance rénale), et cardiaque (insuffisance cardiaque) pour la chimiothérapie conventionnelle, pic hypertensif, cytotoxicité rénale et accidents thromboemboliques pour les thérapies ciblées. De ce fait, la vision orientée vers une prévention basée sur le contrôle de l'hygiène de vie notamment sur la nutrathérapie, néologisme désignant la thérapie préventive par les aliments, semble la plus judicieuse. L'approche préventive est, de toutes les approches, celle qui gagne à être envisagée particulièrement si on sait que cette dernière s'articule principalement sur le simple recours à une alimentation saine. Une telle approche est doublement justifiée d'une part parce qu'elle permet d'agir en amont de la maladie, ce qui limite l'impact de cette dernière, et d'autre part parce qu'elle garantit l'absence d'effets secondaires, ce qui peut être immédiatement vérifié puisqu'il s'agit de recours à des molécules naturelles.

1.5 Relation entre alimentation et cancer

Le rôle de l'alimentation dans la survenue des cancers suscite depuis quelques années un intérêt croissant. Ceci est justifié par les données épidémiologiques qui font état d'une différence d'incidence de nombreux cancers entre les populations. Le cas du cancer de la prostate, où des corrélations ont été établies entre une alimentation riche en graisses et la survenue de ce type de cancer hormono-dépendant (Adjakly 2015). À noter que les premières constatations remontent à 1991, où Muir avait démontré que les immigrants aux USA, natifs de la Chine et du Japon présentaient une incidence de cancer de la prostate nettement plus élevée par rapport aux sujets de mêmes origines vivants dans leurs pays. Cette incidence élevée reste comparable à celle observée dans la population originaire et vivant aux USA, ce qui peut être expliqué par les modifications de leurs habitudes alimentaires (Muir 1991).

Par ailleurs, seulement 5 à 10 % des cancers sont dues à des mutations génétiques héréditaires, alors que dans la plupart des cas, il s'agit d'altération acquises avec le temps sous l'effet de facteurs endogènes (stress oxydatif, inflammation, hormones...) et exogènes (facteurs environnementaux). L'alimentation, la nutrition et l'activité physique représentent les facteurs environnementaux les plus importants incriminés dans la genèse des cancers (Source: WCRF/ AICR, 2007). Selon plusieurs études, et en se basant sur les informations figurant dans le rapport de la World Cancer Research foundation (WCRF), il semblerait que le tiers des cancers soient causés par une mauvaise alimentation (WCRF/ AICR, 2007). De plus, plusieurs autres études ont démontré la contribution de l'alimentation saine dans la prévention tumorale de 75% des tumeurs gastriques et œsophagiques, 66% des tumeurs hépatiques, 50% des tumeurs mammaires, 33% des cancers pulmonaires et 20% dans les tumeurs prostatiques et celle de l'utérus (Société canadienne du cancer). Ce fait a amené les pouvoirs publics, ainsi que d'autres instances, à investir de plus

en plus dans la recherche dans ce domaine de prévention et une subvention de 46 millions de dollars a été donc fournie au Canada durant l'année 2011 et 2012.

Le recours à la prévention est donc fortement justifié dans le combat mené contre le cancer, «Prévenir vaut mieux que de guérir» est un axiome basique, mais d'impact spectaculaire sur la maladie qui pourrait perdre implicitement du terrain grâce à des gestes et faits simples, notamment le changement des habitudes alimentaires.

Il faut noter, toutefois, qu'une étude récente de chercheurs de l'Université Johns Hopkins (USA) ayant suscité un grand nombre de critique dès sa parution dans la revue «*Science*» avait démontré que les mutations spontanées survenant par hasard à chaque division de cellules souches, jouent un rôle important dans le développement du cancer. Ces mutations, une fois accumulées dans l'ADN, vont entraîner l'échappement de la cellule aux systèmes contrôlant sa croissance et son acquisition de propriétés cancéreuses. Ces auteurs avaient démontré que seulement 1/3 des cancers peuvent être expliqués par l'action des facteurs environnementaux ou bien une prédisposition génétique et que dans la majorité des cas ils sont dus à ces mutations spontanées (Tomasetti et *al.*, 2015). Or, la plupart des mutations qui apparaissent par hasard ne parviennent jamais à évoluer suffisamment pour se transformer en une maladie entraînant un cancer cliniquement détectable. Le cas du cancer des sein, où 50% des femmes après 40 ans présentent des lésions précancéreuses, alors que l'incidence du cancer du sein n'est que de 15% ce qui sous entend le rôle d'autres facteurs tel que les facteurs environnementaux comme moyen permissif pour l'évolution de ces lésions précancéreuses. Donnons l'exemple aussi des japonais présentant une incidence élevée de microtumeur de la prostate similaire aux données des pays occidentaux alors que l'incidence du cancer de la prostate est dix fois moins fréquent dans ce pays. Ceci témoigne du rôle des facteurs additionnels

tel qu'un mode de vie sain capable d'empêcher l'évolution de ces lésions précancéreuses vers un cancer avéré (Béliveau, 2015).

1.5.1 Effets bénéfiques d'une alimentation saine sur la santé

Selon les recommandations formulées par la Société canadienne du cancer, il est conseillé d'avoir un régime alimentaire riche en fibres, fruits et légumes, donc une alimentation riche en composés phytochimiques, et d'éviter celle riche en gras et calorique. En effet, chaque portion de fruits et légumes contient 10% de l'ensemble des milliers de composés phytochimiques qui possèdent des propriétés chimiopréventives (Surh, 2003). À cet effet, il est à souligner que certains aliments ayant des propriétés chimiopréventives sont riches en molécules phytochimiques permettant ainsi d'élargir leurs mécanismes d'action. Par exemple, le brocoli contient des sulforaphanes et de la quercétine qui sont connus respectivement pour être proapoptotique et ayant des pouvoirs antioxydants (Juge *et al.*, 2007; Boots *et al.*, 2008.). En revanche, d'autres aliments préventifs ne contiennent qu'une seule molécule phytochimique agissant sur plusieurs processus moléculaires à la fois. Tel est le cas pour l'EGCG (épigallocatechine-3-gallate) se trouvant dans le thé vert. Cette catéchine agit sur plusieurs processus tumoraux: inflammatoires, apoptotiques, métastatiques (Khan *et al.*, 2006), et angiogéniques. Ce dernier effet a fait l'objet de plusieurs études au niveau de notre laboratoire, notamment, celles démontrant l'implication des catéchines du thé vert dans l'inhibition de la dégradation de la MEC assurée par les métalloprotéases matricielles (MMPs) (Demeule *et al.*, 2002), ou alors dans l'inhibition de la phosphorylation du VEGFR par le VEGF (Lamy *et al.*, 2002).

De ce fait, il apparaît donc que l'apport des composés phytochimiques, en particuliers ceux d'origine alimentaire, est incontestable en matière de prévention contre le cancer. Ces derniers possèdent plusieurs effets bénéfiques puisqu'ils

affectent plusieurs processus de la tumorigénèse notamment l'apoptose, l'inflammation, la division illimitée non programmée, l'invasion, l'angiogénèse et finalement les métastases (Aggarwal *et Shishodia*, 2006). De plus, la consommation de ce type de composés n'a pas d'effets secondaires sur l'organisme humain comparativement aux médicaments anticancéreux disponibles (Kerbel *et al.*, 2004).

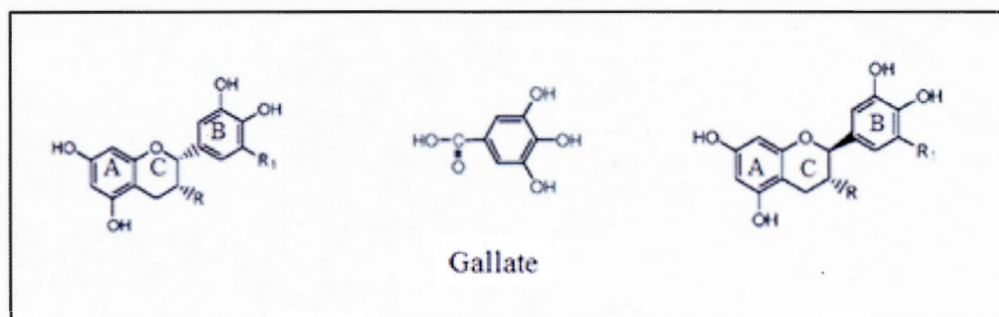
Comprendre la classification et la structure des molécules phytochimiques, en particulier les types de polyphénols, permet de mieux comprendre leurs mécanismes d'actions et par là même, de mieux cerner leurs propriétés à caractère préventif contre le cancer. En effet, la famille des polyphénols est considérée parmi le principal groupe de composés phytochimiques, voire même la plus grande famille trouvée dans la nature (Béliveau *et Gingras*, 2005). Cette dernière comprend trois grandes classes dont les acides phénoliques, les polyphénols non flavonoïdes, et enfin la classe des flavonoïdes, qui est de grande envergure et qui présente 60% de l'ensemble des composés polyphénoliques (Ramos, 2007).

De plus, et en se basant sur la structure chimique des flavonoïdes, il ressort que celle-ci contient six sous-classes: les anthocyanidines, les isoflavones, les flavanones, les flavones et les flavonols, et les catéchines (Graf *et al.*, 2005). Ainsi, la sous-classe des catéchines qui fait l'objet de notre étude, a été choisie pour d'éventuelles explorations plus approfondies compte tenu de ses effets bénéfiques sur la santé et particulièrement dans le domaine de la prévention contre le cancer. En effet, l'EGCG est l'une des catéchines les plus efficaces, et compte tenue de ses capacités à traverser la barrière hémato-céphalique lui permettant d'atteindre le cerveau chez la souris (Suganum *et al.*, 1998), elle constitue un support d'intérêt capital en recherche puisqu'elle ouvre plusieurs voies vers la possible prévention des cancers cérébraux.

1.5.2 Structures chimiques des catéchines

Les catéchines, qui sont au nombre de neuf, (-)-C (catéchine), (+)-C (catéchine), CG (catéchine-3-gallate), GC (gallocatéchine), GCG (gallocatéchine-3-gallate), EC (épicatechine), ECG (épicatechine-3-gallate), EGC (épigallocatéchine), EGCG (épigallocatéchine-3-gallate), contiennent deux noyaux benzènes : A et B, comportant plusieurs groupements hydroxyles liés par un noyau pyrène contenant un oxygène (Erlund, 2004). La présence d'un hétérocycle (cycle C) ne contenant pas de doubles liaisons est également notée ainsi que deux atomes additionnels d'hydrogènes comparativement aux deux autres types de cycles. Par ailleurs, il existe deux formes en miroir dont une positive (+) liée au pouvoir antioxydant, et la seconde négative (-), qui induit l'oxydation ainsi que la mort cellulaire chez les végétaux.

En outre, EC est un épimère contenant deux groupements hydroxyles sur le cycle B et un seul groupement hydroxyle au niveau du cycle C (Figure 1.6). La différence structurale entre l'EGC et l'EC est caractérisée par la présence d'un groupement additionnel hydroxyle au niveau du cycle B de l'EGC. Quant à l'ECG et l'EGCG, ils sont respectivement des dérivés esters de l'EC ainsi que EGC. En fait, il s'agit d'une estérification avec un gallate hydroxyle sur le cycle C (Braicu *et al.*, 2013).



Catéchines	R	R1
EGCG	Gallate	OH
EGC	OH	OH
ECG	Gallate	H
EC	OH	OH

Catéchines	R	R1
GCG	Gallate	OH
GC	OH	OH
CG	Gallate	H
C	OH	OH

Figure 1.6 Structure chimique des catéchines du thé vert. Les catéchines, qui sont au nombre de neuf, (-)-C (catéchine), (+)- (C) (catéchine), CG (catéchine-3-gallate;), GC (gallocatéchine), GCG (gallocatéchine-3-gallate), EC (épicatechine), ECG (épicatechine-3-gallate), EGC (épigallocatéchine), EGCG (épigallocatéchine-3-gallate), contiennent deux noyaux benzènes (A,B), comportant plusieurs groupements hydroxyles, liés par un noyau pyrène contenant un oxygène (C) (Erlund *et al.*, 2004). La présence d'un hétérocycle (cycle C) ne contenant pas de doubles liaisons, est également notée, ainsi que deux atomes additionnels d'hydrogènes comparativement aux deux autres types de cycles. Les groupements R, R₁, correspondent à des radicaux variables selon la catéchine comme montré sur le tableau.

1.5.3 Sources alimentaires des catéchines

Une des principales sources de catéchines est le thé (Tableau 1.2) (Hollman et Kantan, 1997). Cependant, le type de thé ainsi que la manière dont il a été traité et fermenté s'avère décisif sur sa teneur en catéchines. Elle n'est pas la même dans le thé vert, noir et le thé blanc. Aussi, le thé vert peut contenir jusqu'à 6 % (des poids des feuilles) de catéchines (Béliveau et Gingras, 2005).

En effet, 30 à 40 % des composés d'une tasse de thé vert (100 ml) sont un mélange de catéchines, dont l'EGCG présente le plus grand pourcentage de catéchines (48- 55 %), suivi des EGC et ECG (9 -12%), et finalement de l'EC (5-7%) (Balentine *et al.*, 1997). Cependant, la concentration plasmatique de l'EGCG, après la prise de 2 à 3 tasses de thé vert, est de l'ordre de 0,1 à 0,6 μM , et ne dépassant pas le 1 μM après une prise de 7 à 9 tasses. Cette faible biodisponibilité des catéchines du thé doit être donc prise en considération si on veut extrapoler les résultats obtenus *in vitro* aux situations *in vivo* (Lee *et al.*, 1995, Tachibana 2011).

De plus, le thé vert a un effet préventif dans la mesure où il diminue le risque d'atteinte de plusieurs cancers dont 60 % des cas de cancers gastriques, 50% de cas de cancers de la prostate, 40% des cas de cancers mammaires et finalement 20 % des cas de cancers pulmonaires (Béliveau et Gingras, 2014).

Aliments	Catéchines, mg/100g d'aliment
Abricot	20
Poires	9
Pommes	21
Raisin	1
Pêche	10.5
Haricot	12
Choux fleur	3
Aubergines	0,5
Betteraves	1
Radis	0,1
Poireaux	1
Cidre	6
Jus de pommes	17
Jus d'abricot	1
Thé vert	169
Thé noir	22
Vin rouge	25

Tableau 1.2 Sources alimentaires des catéchines (Ruidavets *et al.*, 2000).

CHAPITRE II

PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS

2.1 Problématique

Le développement tumoral est un processus multi étapes dont les plus importantes sont l'angiogenèse tumorale et les métastases. Ces processus sont marqués par plusieurs signatures moléculaires dans lesquels l'expression de la périostine joue un rôle important dans l'activation des différentes voies de signalisation, et ce en régulant le caractère invasif dans plusieurs types de cancers pulmonaires, ovariens et mammaires. Toutefois, l'implication de la périostine dans le cancer du cerveau reste jusqu'à ce jour peu connue.

Par ailleurs, plusieurs études épidémiologiques ont démontré l'apport d'une saine alimentation dans la prévention cancéreuse, puisqu'elle permettrait d'éviter près d'un tiers des cancers. Parmi ces aliments, on cite le thé vert et la contribution de ses molécules de catéchines dans l'inhibition du processus de l'angiogenèse. Dans le cancer du cerveau, cette inhibition est liée entre autre à la dégradation de la MEC par les MMPs (Annabi *et al.*, 2002), et à la phosphorylation du VEGFR (Lamy *et al.*, 2002).

2.2 Hypothèse de travail

En s'appuyant sur la contribution de la périostine dans le processus tumoral, et du fait que les molécules du thé vert contribuent à l'inhibition de certains de ces processus, nous émettons l'hypothèse qu'un traitement des cellules tumorales

cérébrales avec les catéchines du thé vert bloquerait l'angiogenèse induite par la périostine dans le cancer du cerveau, ce qui ouvre une voie importante pour les enjeux liés à la prévention tumorale.

2.3 Objectifs de recherche

Afin de déterminer l'impact des molécules du thé vert sur la progression tumorale induite par la périostine, nous avons fixé les objectifs de cette étude, à déterminer:

1. le niveau d'expression protéique et de sécrétion de la périostine dans différentes lignées cellulaires dérivées de glioblastomes humains (U87, U251, U138).
2. l'effet des différentes catéchines sur le niveau de sécrétion ainsi que sur l'expression génique et protéique de la périostine dans les U251.
3. l'effet des catéchines du thé vert sur les aspects cellulaires induits par la périostine sécrétée par le compartiment tumoral, notamment sur la tubulogenèse, la migration cellulaire ainsi que sur la signalisation cellulaire de la voie ERK au niveau du compartiment endothélial.

CHAPITRE III

MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 MATÉRIEL

La périostine recombinante, sous forme lyophilisée, a été fournie par R&D Systems (Recombinant Human Periostin/OSF-2, cat# 3548-F2-050). Les catéchines: (+)-C, EC, GC, ont été fournies par Sigma-Aldrich (Oakville, ON) alors que: (-) – C, CG, GCG, ECG, EGC et EGCG ont été fournies par MP Biomedicals (Solon, OH). Le VEGF recombinant humain a été fourni par R&D Systems (Minneapolis, MN). Les différentes lignées cellulaires de glioblastomes (U87, U251, U138) et les cellules endothéliales HBMECs ont été achetées respectivement de la compagnie ATCC (American Type Culture Collection (ATCC; Manassa, VA) et de PromoCell GmbH (Heidelberg, Allemagne). La migration cellulaire est effectuée à l'aide du Real-Time Cell Analyzer (RTCA) dual-plate (DP), et du system xCELLigence (Roche Diagnostics, QC). Le Matrigel utilisé pour les essais de tubulogenèse (Matrigel basement membrane matrix growth factor reduced) provient de BD Bioscience (Missauga, ON). La viabilité cellulaire est mesurée à l'aide du réactif WST-1 provenant de Life Science (Roche, France). Les anticorps dirigés contre pERK (#4370), sont de Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Les anticorps contre ERK (#sc-94) viennent de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). L'anticorps contre la périostine est de abcam (abc 152099). Les produits d'électrophorèse (acrylamide, TEMED, APS, SDS) proviennent de Bio-Rad (Mississauga, ON). Les échantillons protéiques sont dosés par micro-BCA (Pierce, Rockfort, IL). Les tubes pour concentration des milieux de culture conditionnés proviennent de (Millipore, cat # UFC 501096, Temecula, CA). L'extraction de l'ARN total est réalisée à l'aide de

TRIzol (Invitrogen, Burlington, ON). La synthèse d'ADNc à partir de l'ARN total est effectuée à l'aide du kit high capacity cDNA reverse transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA) tandis que la mesure des amplicons est effectuée par PCR en temps réel à l'aide de SYBR Green (Bio-Rad, cat. #170-8882, Mississauga, ON). Les autres réactifs proviennent de chez Sigma-Aldrich (Oakville, ON).

3.2 Méthodes

3.2.1 Culture cellulaire

Les cellules U87 et U138 sont cultivées à 37°C sous une atmosphère humide à 5 % de CO₂ et 95 % d'air, dans un milieu de culture EMEM (Wisent, #cat 320-006CL) contenant 10 % (v/v) sérum de veau (SV) (HyClone Laboratories, Logan, UT), 1 mM de sodium pyruvate (Sigma-Aldrich, Oakville, ON), 2 mM glutamine (Gibco, #cat 25030), 100 unités/ml pénicilline et 100 mg/ml streptomycine (Wisent, #cat 250-202-el). Les cellules U251 sont cultivées à 37°C, sous une atmosphère humide à 5 % de CO₂ et 95 % d'air dans un milieu de culture DMEM (Wisent, #cat 319-020CL) contenant 10% (v/v) sérum fœtal bovin (FBS) (HyClone Laboratories, Logan, UT), 100 unités/ml pénicilline et 100mg/ml streptomycine (Wisent, #cat 250-202-el). Les HBMECs sont cultivées à 37°C sous une atmosphère humide à 5 % de CO₂ et 95 % d'air dans le milieu RPMI 1640 (Gibco, Burlington, ON) contenant 10% (v/v) sérum fœtal bovin inactivé (FBSi) (HyClone Laboratories, Logan, UT), 10 % (v/v) NuSérum (BD Bioscience, Mountain View, CA), 100 unités/ml pénicilline et 100 mg/ml streptomycine (Wisent, #cat 250-202-el), un supplément de croissance de cellules endothéliales à 30 µg/ml (Milipore, Temecula, CA). Les cellules HBMECs sont utilisées du passage 3 au passage 7.

3.2.2 Test de la Viabilité cellulaire mesurée à l'aide du réactif WST-1

L'effet des différentes catéchines sur la viabilité cellulaire est étudié en utilisant le test WST-1 (cat #11644607001, Roche). Ce test est basé sur la capacité de la déshydrogénase mitochondriale des cellules saines actives à cliver l'anneau tétrazolium du produit jaune pâle libérant ainsi, un crystal bleu foncé de formazan imperméable aux membranes cellulaires. Le formazan, un fort absorbant à longueur d'onde de 550 nm, s'accumule dans les cellules saines. Par conséquent, le nombre de cellules viables est directement proportionnel au niveau de formazan produit. Une analyse colorimétrique simple à l'aide d'un spectrophotomètre permet donc de déterminer la toxicité du produit. Au cours de cette étude, les cellules U251 et HBMECs sontensemencées dans une plaque de 96 puits. Le jour suivant, différentes concentrations des catéchines sont ajoutées dans le milieu de culture. Après 18 h, 10 μ l de la solution de WST-1 sont ajoutées dans chaque puits pour obtenir une concentration finale de 0,5 mg/ml. Finalement, les cellules U251 sont alors incubées 60 min, alors que les cellules HBMECs sont incubées pendant 45/ 90 min à 37°C, une lecture est effectuée à l'aide d'un lecteur de plaques à une longueur d'onde de 562 nm.

3.2.3 Lyse cellulaire et récolte du milieu de culture conditionné

Les cellules sont cultivées dans des plaques de six puits pendant 48h, puis traitées pendant 18h avec différentes concentrations de catéchines ou tout simplement sevrées dans un milieu sans sérum. Après le traitement, le milieu de culture conditionné est récolté et centrifugé pendant 3 min à 3 000 rpm, puis concentré (1,2, 5, X) et cela suivant les instructions du manufacturier (Millipore, Temecula, CA). Les cellules sont ensuite lavées une fois à l'aide d'une solution de PBS froid (pH 7.4) contenant dans le cas des protéines phosphorylées 1mM de NaF et de Na_3VO_4 , pour être ensuite incubées pendant 30 min dans le même tampon. Enfin, les cellules ont été

décollées à l'aide d'un policeman et lysées durant 30 min, sur glace dans une solution contenant Tris-HCl 10 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, NP-40 0,5%, EDTA 1mM, EGTA 1 mM. Les débris cellulaires sont enlevés par une centrifugation à 13, 000 rpm de 10 min à 4°C.

3.2.4 Dosage des protéines selon la méthode de microBCA

Le contenu protéique des lysats cellulaires est quantifié par microBCA selon les directives du fabricant (Pierce). Plus précisément, la quantité de protéines a été dosée en utilisant différentes concentrations d'albumine sérique bovine (BSA) pour tracer la courbe standard. 150 µl de chaque échantillon et des solutions standards ont été ajoutés à 150 µl du réactif de MicroBCA dans une plaque de 96 puits. Par la suite, la plaque a été incubée à 37°C pendant 2 h. Finalement, le produit de réaction pourpre formé par une liaison de coordination a été mesuré à une longueur d'onde de 562 nm.

3.2.5 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Une quantité égale de protéines pour chaque échantillon est ensuite remise en suspension dans un tampon réducteur contenant 62,5 mM Tris-Hcl (pH 6.8), 10% glycérol, 2% SDS, 5% β-mercapto-éthanol et 0,00625% bromophénol. Les échantillons sont bouillis à 95°C pendant 5 minutes avant d'être soumis à l'électrophorèse. Les gels d'entassement sont composés de 3,8% de polyacrylamide/bisacrylamide dissout dans une solution tampon 0,125 M de Tris-Hcl (pH 6.8), 0,1% SDS, 1 µl/ml de TEMED et 0,5 mg/ml d'APS tandis que le pourcentage de polyacrylamide/bisacrylamide varie pour les gels de séparation en fonction de la protéine d'intérêt. De plus, le tampon de séparation est composé de 0,375 M Tris-Hcl (pH 8.8), 0,1% SDS, 1 µl/ml de TEMED et 0,5 mg/ml d'APS. Les protéines des échantillons sont séparées selon leur poids moléculaire par SDS-PAGE. Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF à l'aide

du Trans-Blot Turbo RTA transfer Kit (Biorad, CA), qui est par la suite bloquée une heure à température pièce dans une solution de TBST contenant 5% de lait en poudre.

3.2.6 Immunodétection des protéines

Les membranes subissent par la suite trois lavages successifs de 15 min dans du TBST 0,3% et sont incubées avec une dilution de l'anticorps primaire dans le TBST 0,3% contenant 3% de BSA toute la nuit à 4°C. Ensuite, une autre série de lavages est réalisée avant que les membranes ne soient incubées avec l'anticorps secondaire respectif conjugué à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch, Baltimore, PA) dilué à 1/2500 dans du TBST contenant 5% lait en poudre durant une heure à température pièce. La détection des protéines d'intérêts est réalisée à l'aide d'une solution de ECL (Amersham, Biosciences, Baie d'Urfée, QC) ou d'ECL pro (Perkin Elmer) sur un film d'autoradiographie.

3.2.7 Extraction de l'ARN total

Les cellules sont cultivées dans des plaques de culture de six puits pendant 48h et sont traitées à 25 μ M de différentes catéchines pendant 18h. L'ARN total des cellules est isolé en utilisant 1 ml de TRIzol conformément aux instructions du manufacturier (Invitrogen). Plus précisément, 200 μ l de chloroforme sont ajoutés au TRIzol. Le mélange est ensuite maintenu à température pièce durant 3 min après une agitation vigoureuse de 15 sec. Par la suite, le tout est centrifugé pendant 15 min à une vitesse de 12 000 g à 4°C. Puis, la phase supérieure est récupérée et 500 μ l d'isopropanol sont ajoutés. Après une période d'incubation de 10 min à température pièce, le mélange est centrifugé à 12 000 g pour 10 min à 4°C. Le surnageant est ensuite enlevé et remplacé par 1 ml d'éthanol 75% dans le but de laver le culot d'ARN et le tout est centrifugé une dernière fois durant 10 minutes à 12 000 g à 4°C. L'ARN obtenu est resuspendu dans 20 μ l d'eau RNase-free et quantifié par

absorbance à une longueur d'onde de 260 nm. Finalement, les échantillons sont congelés à -80°C jusqu'à utilisation.

3.2.8 Synthèse d'ADNc et RT-PCR en temps réel

Deux μg d'ARN ont été utilisés pour la synthèse d'ADNc par transcription inverse (RT) à l'aide du « high capacity cDNA reverse transcription kit » (Applied Biosystems, Foster City, CA) dans un volume réactionnel de 25 μL . La réaction de RT est réalisée selon le programme suivant: 25°C pendant 10 min; 37°C pendant 120 min et 85°C pendant 5 sec. Ensuite, l'ADNc est utilisé pour réaliser la PCR quantitative. Au début de la PCR, les brins complémentaires sont dénaturés en chauffant les échantillons à 95°C pendant 3 min. L'amplification des ADNc d'intérêts s'est déroulée pendant 40 cycles. Chacun des cycles comprenait un chauffage à 95°C pendant 15 sec afin de séparer les brins, puis la température s'abaissait à $62,5^{\circ}\text{C}$ pendant 1 min pour permettre l'appariement des amorces sur le brin matrice, finalement la température s'élevait à 72°C durant 30 sec afin de permettre l'élongation du brin complémentaire par la Taq Polymérase. L'amplification des ADNc est mesurée par fluorescence en utilisant un Icyler (Bio-Rad, Hercules, CA). Cet appareil détecte la fluorescence générée par le SYBR Green (Bio-Rad, Hercules, CA) qui s'intercale dans l'ADN double brin formé lors de la réaction de PCR. La quantité relative de l'ARNm du gène cible par rapport au contrôle interne, l'ARNm 18S ribosomal, est calculée par la méthode (ΔC_T). Au cours de la réaction enzymatique, le logiciel d'exploitation des données IQ5 (Bio-Rad, Hercules, CA) affiche un graphique du signal de fluorescence versus le nombre de cycles au cours de la PCR en temps réel. Finalement, les différences (ΔC_T) entre les valeurs moyennes en duplicatas et ceux des contrôles internes (GAPDH et β -actine) sont également calculées et exprimées en unité relative par le logiciel iQ5 Optical System Software version 2.0 (Biorad, Hercules, CA).

Les amorces de la périostine ont été synthétisées par InvitrogenTM, (hPerio-S, cat# 15612-UO4FSF4) pour l'amorce sens, et (hPerio-AS1, cat# A15612-UO5OQMC) pour l'amorce anti sens. Les amorces de GAPDH (Hs_GAPDH_2_SG QT01192646) et β -actine (Hs_Actb_2_SG QT01680476) ont été synthétisés par QIAGEN (Valencia, CA).

3.2.9 ARN interférence

Les cellules U251 ont été transfectées avec 20 nM de quatre différents si-ARN contre la périostine: (HS_POSTN_1, cat# SI00088823), (HS_POSTN_2, cat# SI00088830), (HS_POSTN_6, cat# SI2637509), (HS_POSTN_7, cat# SI03067113), ou alors avec 20 nM de séquence aléatoire (ALLStar Negative Control siRNA, cat# 1027281) en utilisant l'agent de transfection Lipofectamine 2000 (InvotrogenTM, cat# 11668).

3.2.10 Essai de migration cellulaire en temps réel

La migration des HBMECs est effectuée à l'aide du Real-Time Cell Analyzer (RTCA) dual-plate (DP), avec le system xCELLigence (Roche Diagnostics, QC). L'utilisation du système selon les instructions du manufacturier. Après 24 h de sevrage des HBMECs dans un milieu sans sérum, les cellules ont été trypsinisées puis ensemencées sur des plaques 16 puits CIM-plates 16 (Roches diagnostics). Chaque plaque est constituée de deux chambres: une supérieure et une inférieure. La première contient les cellules tandis que la deuxième contient le chimioattractant. Les deux chambres sont séparées par une membrane poreuse (8 μ m), contenant sur sa partie inférieure des microélectrodes en or. La migration des cellules HBMECs de la chambre supérieure vers la chambre inférieure par le chimioattractant en traversant la membrane poreuse, génère une augmentation de l'impédance électrique qui est

mesurée en temps réel par le RTCA DP, et est représentée par une unité arbitraire qui est l'indice cellulaire.

Au préalable, les chambres supérieures sont revêtues de gélatine (0,15%) (p/v) durant une heure à 37 °C. Pour être ensuite lavées avec une solution PBS, et 50 µl de milieu de culture ont été déposés et incubés durant 1 h à 37°C. Durant cette période d'incubation, les cellules sont trypsinisées et resuspendues dans un milieu de culture RPMI, afin d'obtenir une concentration de 250 000 cellules/ml. Par la suite, 162 µl du milieu de culture contenant différentes concentrations de chimioattractants (périostine recombinante, 25 µM de catéchines, ou VEGF 25 ng/ml), sont déposés dans la partie inférieure des puits. 100 µl des suspensions cellulaires sont ensuite déposées sur la partie supérieure de l'insert et après 15 min à température pièce, puis 15 min d'incubation à 37°C d'adhésion des cellules, la migration a été initiée à 37°C sous une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Au final, la migration était mesurée chaque 5 min pendant 24 h.

3.2.11 Essai de tubulogénèse sur Matrigel

Des aliquots de 50 µL de Matrigel sont déposés dans chaque puits d'une plaque de 96 puits. Celle-ci est incubée à 37°C pendant au moins 10 min afin de permettre la polymérisation du produit. Durant cette période d'attente, les cellules HBMECs sont trypsinisées et resuspendues dans du milieu RPMI afin d'obtenir une suspension cellulaire d'une concentration finale de 10⁶ cellules/mL dont 100 µl sont ensuite déposés sur Matrigel. Après une heure, les cellules sont incubées à 37°C avec du milieu de culture conditionné provenant des cellules U251 préalablement traitées avec 25 µM de catéchines ou alors transfectées avec un si-Périostine. Après 3 h, des photographies sont prises par microscopie à contraste de phase à un agrandissement 10 X. L'analyse des structures de type capillaire a été effectuée à l'aide du logiciel ImageJ.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS

4.1 Expression de la périostine dans différentes lignées cellulaires

Afin d'identifier un modèle cellulaire permettant l'investigation du niveau de sécrétion et d'expression protéique de la périostine *in vitro*, nous avons procédé à l'analyse de trois lignées cellulaires dérivées de glioblastomes humains: U87, U251 et U138. Avant de procéder à une récolte du milieu de culture conditionné, les cellules ont étéensemencées, cultivées pendant 48 h et sevrées pendant 18 h dans un milieu sans sérum. L'expérience est conclue par une électrophorèse suivie d'un immunobuvardage de type Western. Les résultats obtenus, illustrés à la Figure 4.1 A montrent que l'expression protéique la plus importante est mesurée dans les cellules U138 et U251 avec une baisse d'expression dans les U87. Cependant, en ce qui concerne la sécrétion, nous remarquons que seules les cellules U251 secrètent la périostine (Figure 4.1 B). Elles ont donc été choisies comme modèle cellulaire dans notre étude.

4.2 Concentration du milieu de culture conditionné des cellules U251

Les cellules U251 ont étéensemencées pendant 48 h, puis sevrées dans un milieu sans sérum. Le milieu de culture conditionné contenant la périostine a ensuite été récolté. Afin d'avoir une quantité de périostine détectable par immunobuvardage, le milieu de culture conditionné a été concentré (1, 2, ou 5 X). Lorsque le milieu de culture conditionné est concentré deux fois (2X), la périostine est détectée en quantité

suffisante par immunobuvardage (Figure 4.1 C). Notons que lorsque le milieu n'est pas concentré le niveau de sécrétion est pratiquement indétectable.

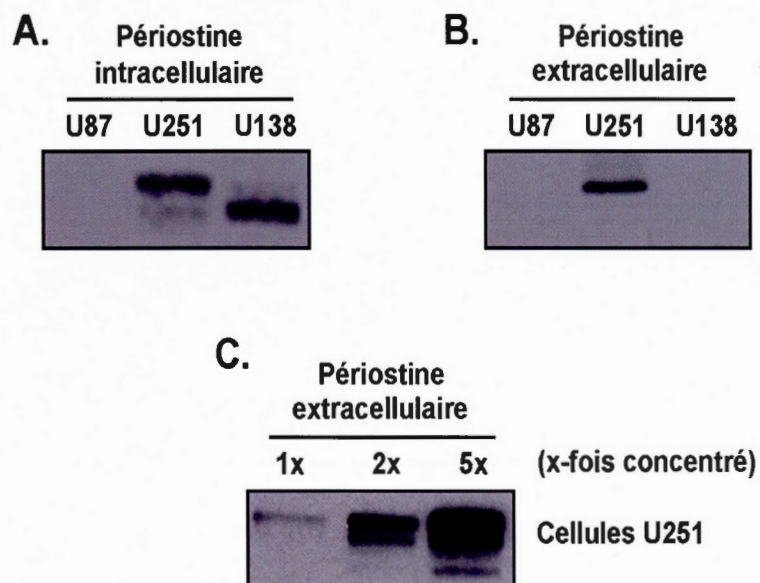


Figure 4.1 Niveaux de sécrétion et d'expression protéique de la périostine dans différentes lignées cellulaires. Les cellules ont été ensemencées pendant 48 h et sevrées pendant 18 h dans un milieu sans sérum, pour ensuite subir soit une lyse cellulaire (A), soit une récolte du milieu de culture conditionné (B). Enfin, une électrophorèse suivie d'un immunobuvardage de type Western ont été effectués. Afin d'avoir une concentration de périostine détectable par immunobuvardage dans les milieux de culture conditionnés des cellules U251, nous avons concentré ces mêmes milieux 1, 2 ou 5 X (C). Les résultats présentés sont issus d'une expérience représentative.

4.3 Effets des catéchines sur l'expression de la périostine au niveau du compartiment tumoral

4.3.1 Effet sur la sécrétion de la périostine

Dans le but de déterminer l'effet des catéchines sur le niveau de sécrétion de la périostine par le compartiment tumoral, le milieu de culture conditionné des cellules U251 a été récolté après un traitement de 18 h avec différentes catéchines à une concentration de 25 μ M dans du milieu sans sérum. Parmi les catéchines testées, seules EGCG, CG, GCG, EGC, GC et ECG semblent inhiber la sécrétion de la périostine avec un pourcentage de: 100 %, environ 60 %, 50 %, ~40%, 15 %, et 2 % respectivement (Figure 4.2 C). En revanche, nous remarquons une stimulation de plus de deux fois par les catéchines (+)-C, (-)-C. Notons également l'usage de la bréfeldine A comme un contrôle positif. Cet agent conduisant à l'accumulation des protéines dans le réticulum endoplasmique empêchant ainsi leur transport à travers l'appareil de Golgi. Ici, elle mène à une inhibition de 75 % de la sécrétion de la périostine, mais pas de l'expression protéique.

4.3.2 Effet sur l'expression protéique et génique de la périostine

Afin d'évaluer l'effet de nos molécules sur l'expression protéique, le même protocole expérimental a été suivi. Une lyse cellulaire a donc été réalisée suivie d'un immunobuvardage. Parmi les neuf catéchines utilisées, l'EGCG inhibait l'expression protéique de la périostine de ~90 %, l'EGC, la GCG, et la GC inhibaient de ~70 %, tandis que le CG stimule deux fois l'expression protéique (Figure 4.2 B).

Enfin, dans le but d'élargir l'étude au niveau génique, les catéchines présentant le plus grand pouvoir inhibiteur au niveau protéique et/ou de la sécrétion (Figure 4.2 B-C) ont été testées par qRT-PCR. Pour ce faire, les U251 ont été incubées pendant 18 h avec les catéchines à une concentration de 25 μ M, celle-ci

étant la concentration idéale pour l'ensemble des catéchines. Seules ECG, GCG, CG et EGCG menaient à une inhibition de l'expression génique (inhibition de ~60 % avec GCG, de ~50 % avec CG et EGCG, et de ~30 % avec EGC), contrairement aux GC et EGC (Figure 4.2 A).

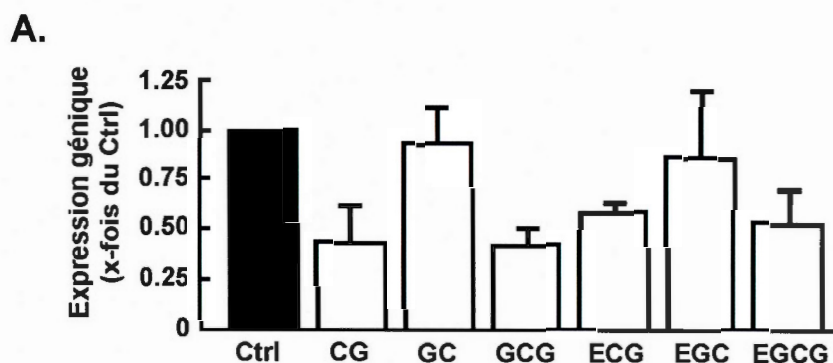
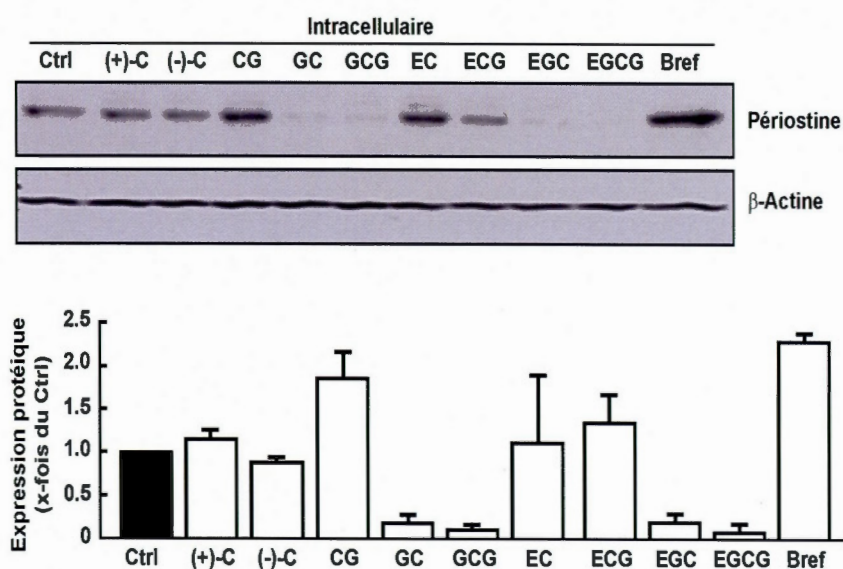


Figure 4.2 A Effets des différentes catéchines sur l'inhibition de l'expression de la périostine au niveau génique, protéique, et de la sécrétion dans les cellules U251. Incubation de 48 h des cellules U251 en présence de 10 % FBS, suivie par un traitement de 18 h dans un milieu sans sérum contenant 25 μ M des différentes catéchines et/ou de bréfeldine A, cet agent conduisant à l'accumulation des protéines dans le réticulum endoplasmique empêchant ainsi leur transport à travers l'appareil de Golgi. (A) l'ARN total a été isolé et l'effet des catéchines CG, GC, ECG, EGC et EGCG sur l'expression génique de la périostine a été quantifié par qRT-PCR. (B) Les cellules U251 ont été lysées et la même quantité de protéines a été chargée sur gel d'électrophorèse et cela afin de visualiser l'effet des traitements sur l'expression protéique de la périostine. (C) De même, le milieu de culture conditionné a été récolté, concentré 2X et le même volume de milieu de culture conditionné a été chargé sur gel d'électrophorèse. La quantification de la densitométrie a été effectuée par le logiciel imageJ. Les résultats présentés sont issus de 3 expériences indépendantes et présentées comme moyennes \pm SEM.

B.



C.

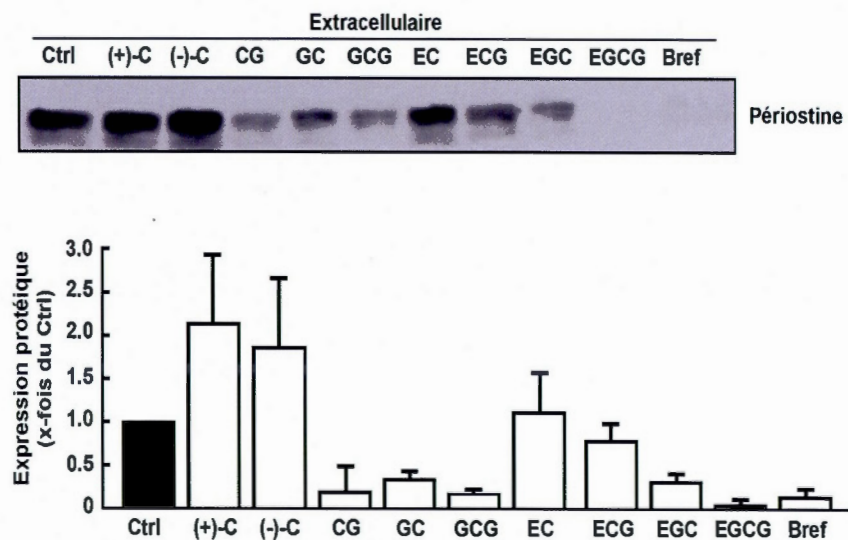


Figure 4.2 (B, C) Effets des différentes catéchines sur l'inhibition de l'expression de la périostine au niveau génique, protéique, et de la sécrétion dans les cellules U251. Incubation de 48 h des cellules U251 en présence de 10 % FBS, suivie par un

traitement de 18 h dans un milieu sans sérum contenant 25 μ M des différentes catéchines et/ou de bréfeldine A. (A) l'ARN total a été isolé et l'effet des catéchines CG, GC, ECG, EGC et EGCG sur l'expression génique de la périostine a été quantifié par qRT-PCR. (B) Les cellules U251 ont été lysées et la même quantité de protéines a été chargée sur gel d'électrophorèse et cela afin de visualiser l'effet des traitements sur l'expression protéique de la périostine. (C) De même, le milieu de culture conditionné a été récolté, concentré 2X et le même volume de milieu de culture conditionné a été chargé sur gel d'électrophorèse. La quantification de la densitométrie a été effectuée par le logiciel imageJ. Les résultats présentés sont issus de 3 expériences indépendantes et présentées comme moyennes \pm SEM.

4.4 Concentration-réponse des catéchines les plus efficaces sur la sécrétion de la périostine

Parmi l'ensemble des catéchines testées, celles présentant le plus grand pouvoir inhibiteur sur la sécrétion de la périostine ont été sélectionnées: CG, GC, GCG, ECG, EGC, EGCG (Figure 4.3). Un test de concentration-réponse a été effectué afin de définir la concentration de catéchines idéale permettant d'inhiber la sécrétion cellulaire de la périostine dans l'environnement tumoral (Figure 4.2 C). Pour cela, les cellules U251 ont étéensemencées pendant 48 h et ont ensuite été traitées pendant 18 h avec différentes concentrations des six catéchines mentionnées plus haut. Pour les catéchines GCG, EGC, ECG, EGCG où le $R^2 > 0,9$, l'inhibition à une concentration de 25 μM est supérieure à ~80 % et leurs IC_{50} , sont respectivement 9,4; 7,6; 5,5 et 3,7 μM . Tandis que pour les catéchines CG et GC où le $R^2 < 0,9$, le pourcentage optimal d'inhibition est à une concentration de 25 μM avec respectivement ~70 % d'inhibition pour la GC et ~50 % pour la CG.

On rappelle ici que IC_{50} , représentant la concentrations nécessaire pour entrainer une inhibition de 50 %, est calculé à l'aide d'un logiciel de traitement de données statistiques PRISM. Les comparaisons entre groupes ont été effectuées par le test statistique ANOVA valable pour les variables continues. Le coefficient de détermination R^2 correspond au pourcentage de variance expliqué par la régression. La réponse est considérée bien expliquée par cette régression lorsque R^2 est proche de 1.

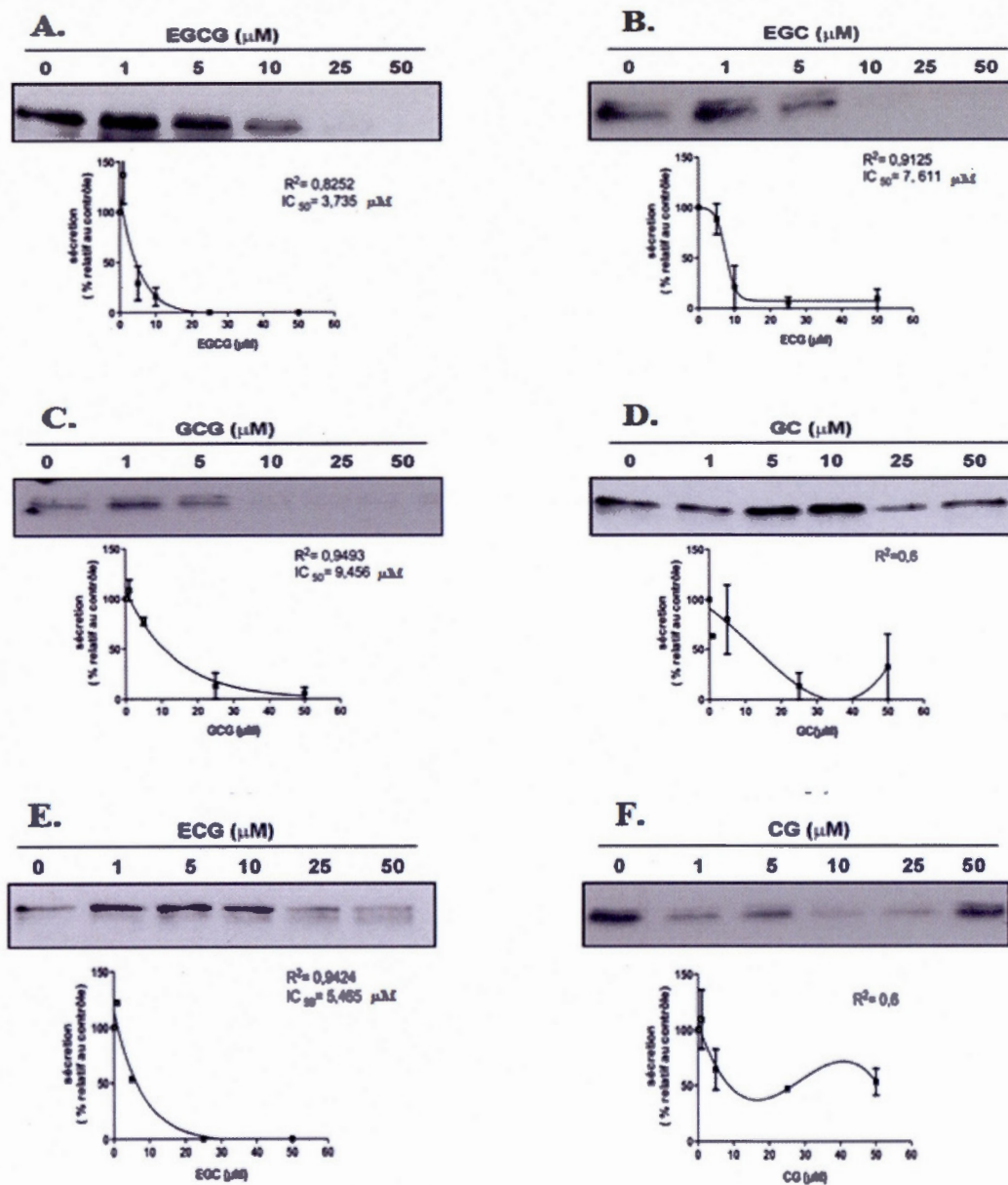


Figure 4.3 Effet des différentes concentrations de catéchines sur la sécrétion de la périostine. Incubation de 48 h des U251 dans 10% sérum de veau, suivie par un traitement de 18 h dans un milieu sans sérum contenant différentes concentrations de catéchines. (A) EGCG, (B) EGC, (C) GCG, (D) GC, (E) ECG, (F) CG. Récolte du milieu conditionné suivie par un immunobuvardage. Les résultats sont présentés

comme la moyenne \pm SEM, et proviennent de trois expériences indépendantes pour (A), deux expériences indépendantes pour (C), (D), (E), (F), et finalement l'expérience la plus représentative pour (B).

4.5 Effets des catéchines sur la viabilité cellulaire des cellules U251 et des HBMECs

Dans le but de s'assurer que les effets observés *in vitro*, tout au long de notre étude, étaient bien attribuables aux effets des catéchines et non pas à de la toxicité cellulaire, un test de cytotoxicité WST-1 a été effectué sur les deux lignées cellulaires U251 et HBMECs, représentant respectivement le compartiment tumoral cérébral et le compartiment endothélial vasculaire. Après un prétraitement des cellules pendant 18 h avec 50 μ M des différentes catéchines, 10 μ L de WST-1 ont été ajoutés. Suite à une incubation de 60 min à 37 °C pour les U251, et de 45 et 90 min pour les HBMECs, l'absorbance du formazan généré par le WST-1 a été mesurée par spectrophotométrie.

Parmi les neuf catéchines, l'EGCG semble être la molécule la plus cytotoxique pour les U251, et la GCG pour les HBMECs, induisant respectivement une mortalité de ~60 %, ~55 % (Figure 4.4 (A- B)). Cependant, les catéchines qui avaient un effet plus cytotoxique que les autres, celles qui induisaient plus de 35 % de mortalité dans les U251 (~40 % pour CG, ~35 % pour la GCG, ~60 % pour EGCG) et dans les HBMECs (~35 % pour la CG, ~55 % pour GCG, ~30 % pour ECG, ~55 % pour EGCG) ont fait l'objet d'une autre étude de viabilité sur un intervalle de concentrations plus large allant jusqu'à 100 μ M (Figure 4.4 C- D). Ainsi, les résultats démontrent qu'à des concentrations plus importantes les catéchines sont plus toxiques. Par exemple, à la concentration de 100 μ M, la viabilité cellulaire est inférieure à 30 %.

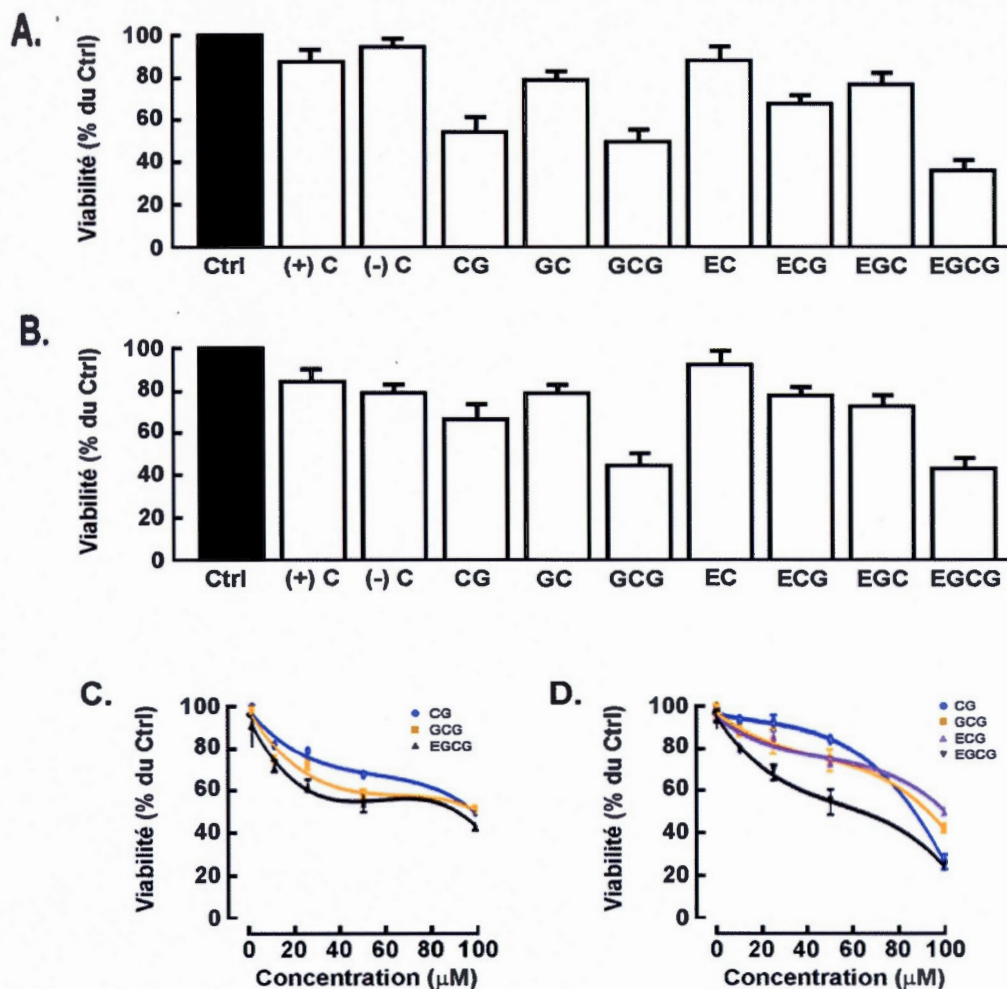


Figure 4.4 Effets des catéchine sur la viabilité cellulaire des cellules U251 et HBMECs Après un prétraitement des cellules pendant 18 h avec différentes catéchines: (-)+ C, (-)- C, CG, GC, GCG, ECG, EGC, EGCG à une concentration de 50 μ M (A,B), 10 μ L de WST-1 ont été ajoutés et l'absorbance du formazan (généré par le WST-1) a été mesurée par spectrophotométrie après une incubation à 37°C de 60 min (U251) (A), 45 et 90 min (HBMECs) (B). Pour les catéchines qui avaient un effet plus cytotoxique que les autres (CG, GCG, ECG, EGCG), l'étude de la viabilité cellulaire des HBMECs et U251 s'est étendue sur un intervalle de concentration plus large (C,D). Les résultats proviennent de quatre duplicatas présentés comme moyennes \pm SEM.

4.6 Répression génique transitoire de la périostine: Effet sur l'expression protéique, génique et sur la sécrétion

Dans un but d'optimisation, l'effet de quatre séquences différentes de si-Périostine sur l'expression génique de la périostine a été évalué. Pour ce faire, les cellules U251 ont été ensemencées pendant 48 h, puis transfectées pendant 24 h avec différents si-Périostine dont les séquences sont décrites dans le chapitre matériel et méthodes, ou avec une séquence aléatoire (si-scrambled: si-scr), à l'aide de la Lipofectamine 2000 comme agent de transfection. Trois expériences ont été par la suite effectuées : récolte des milieux de culture conditionnés appropriés (Figure 4.5 C), lyse cellulaire et un immunobuvardage de type Western (Figure 4.5 B), et extraction d'ARN total par le Trizol suivie d'une qRT-PCR (Figure 4.5 A). Les résultats ont démontré que les quatre séquences ARN-interférents 7, 6, 2, et 1 inhibaient significativement l'expression génique de la périostine comparativement à la séquence aléatoire avec respectivement ~40%, ~30% pour le siPER-2 et 6. Cependant, le niveau génique de la périostine suite à la transfection avec le siPER-1 n'est pas différent du niveau basal, tandis qu'au niveau de l'expression protéique et de la sécrétion, seul le siPER-7 inhibait significativement de ~50% la sécrétion ainsi que l'expression de la périostine.

A.



Figure 4.5 A Effets des différents ARN-interférents sur l'inhibition de l'expression de la périostine au niveau génique, protéique, et dans la sécrétion dans les cellules U251. Incubation de 48 h des cellules U251 dans 10% FBS, suivie par une transfection pendant 24 h avec différents siPer-1, siPer-2, siPer-6, siPer-7 ou avec une séquence aléatoire (si-scr) et d'un sevrage de 18 h dans un milieu sans sérum. Enfin, l'ARN total a été isolé, et l'effet des si-ARN sur l'expression génique a été quantifié par qRT-PCR (A). Les cellules U251 ont été lysées et la même quantité de protéines a été mise sur gel d'électrophorèse afin de visualiser l'effet des transfections sur l'expression protéique de la périostine (B). Enfin, le milieu de culture conditionné a été récolté, concentré (2X) et le même volume de milieu de culture conditionné a été chargé sur gel d'électrophorèse et la quantification effectuée par densitométrie à l'aide du logiciel imageJ (C). Les résultats présentés sont issus de trois expériences indépendantes et présentées comme moyenne \pm SEM.

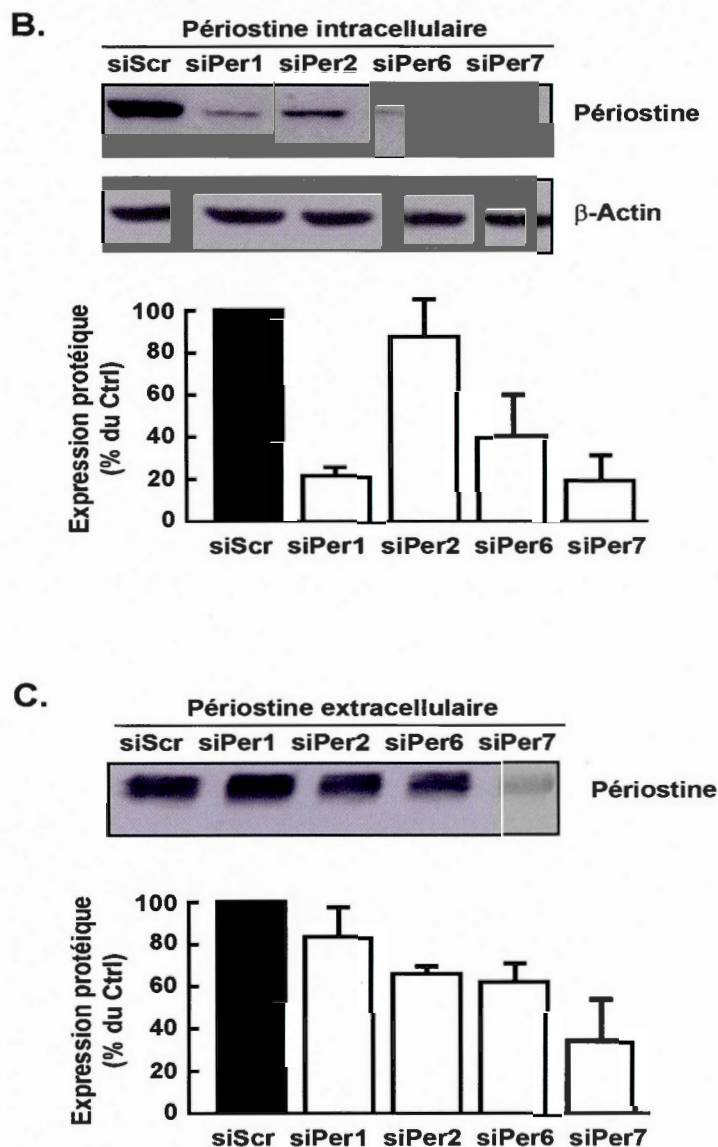


Figure 4.5 (B, C) Effets des différents ARN-interférents sur l'inhibition de l'expression de la périostine au niveau génique, protéique, et dans la sécrétion dans les cellules U251. Incubation de 48 h des cellules U251 dans 10% FBS, suivie par une transfection pendant 24 h avec différents siPer-1, siPer-2, siPer-6, siPer-7 ou avec une séquence aléatoire (si-scr), et d'un sevrage de 18 h dans un milieu sans sérum. Enfin, l'ARN total a été isolé, et l'effet des si-ARN sur l'expression génique a été quantifié par qRT-PCR (A). Les cellules U251 ont été lysées et la même quantité de

protéines a été mise sur gel d'électrophorèse afin de visualiser l'effet des transfections sur l'expression protéique de la périostine (B). Enfin, le milieu de culture conditionné a été récolté, concentré (2X) et le même volume de milieu de culture conditionné a été chargé sur gel d'électrophorèse et dont la quantification a été effectuée par densitométrie à l'aide du logiciel imageJ (C). Les résultats présentés sont issus de trois expériences indépendantes et présentées comme moyenne \pm SEM.

4.7 La périostine sécrétée par le compartiment cellulaire tumoral induit la tubulogenèse du compartiment cellulaire endothélial

La tubulogenèse est l'une des étapes de l'angiogenèse qui est induite sous l'effet de différents facteurs proangiogéniques. Comme il a été déjà démontré que la périostine possède des propriétés proangiogéniques dans le cas des tumeurs mammaires (Rong Shao *et al.*, 2004), nous inférons que ces propriétés pourraient aussi être valables dans le cas des glioblastomes. Afin de le vérifier, nous avons étudié aussi bien l'impact de la périostine sécrétée par le compartiment tumoral (cellules U251) sur la formation des tubules dans le compartiment endothélial (HBMECs), que l'impact des traitements avec les différentes catéchines sur l'inhibition de cette induction. Pour ce faire, les HBMECs ont été stimulées pendant 3 h avec du milieu de culture conditionné concentré 2X provenant des cellules U251 prétraitées avec les catéchines les plus efficaces (CG, GC, GCG, ECG, EGC, EGCG).

La tubulogenèse des cellules HBMECs a été induite sur du Matrigel réduit en facteurs de croissance et dépourvu de cytokines additionnelles. Par conséquent, les tubules formés par le compartiment endothélial ne peuvent qu'être induites que faiblement par les facteurs angiogéniques. Dans la présente étude, nous supposons que c'est la périostine sécrétée par le compartiment tumoral qui en est le plus responsable. Les résultats présentés dans la Figure 4.6 indiquent que le milieu conditionné stimulait à ~65 % la tubulogenèse par rapport au niveau basal (Figure 4.6 B). Toutefois, le traitement des HBMECs avec le milieu de culture conditionné de cellules U251 prétraitées avec GCG, inhibe la stimulation induite par le contrôle positif (MC 2X) et le niveau de la tubulogenèse revient presque au niveau basal.

Parallèlement, afin de démontrer l'importance de la périostine comme facteur proangiogénique nécessaire à la formation des tubules, l'ARN-interférent si-

Périostine 7 (Figure 4.5) a été utilisé menant à une inhibition de 30 % de la formation de la tubulogénèse par rapport au si-scrambled (Figure 4.6 D).

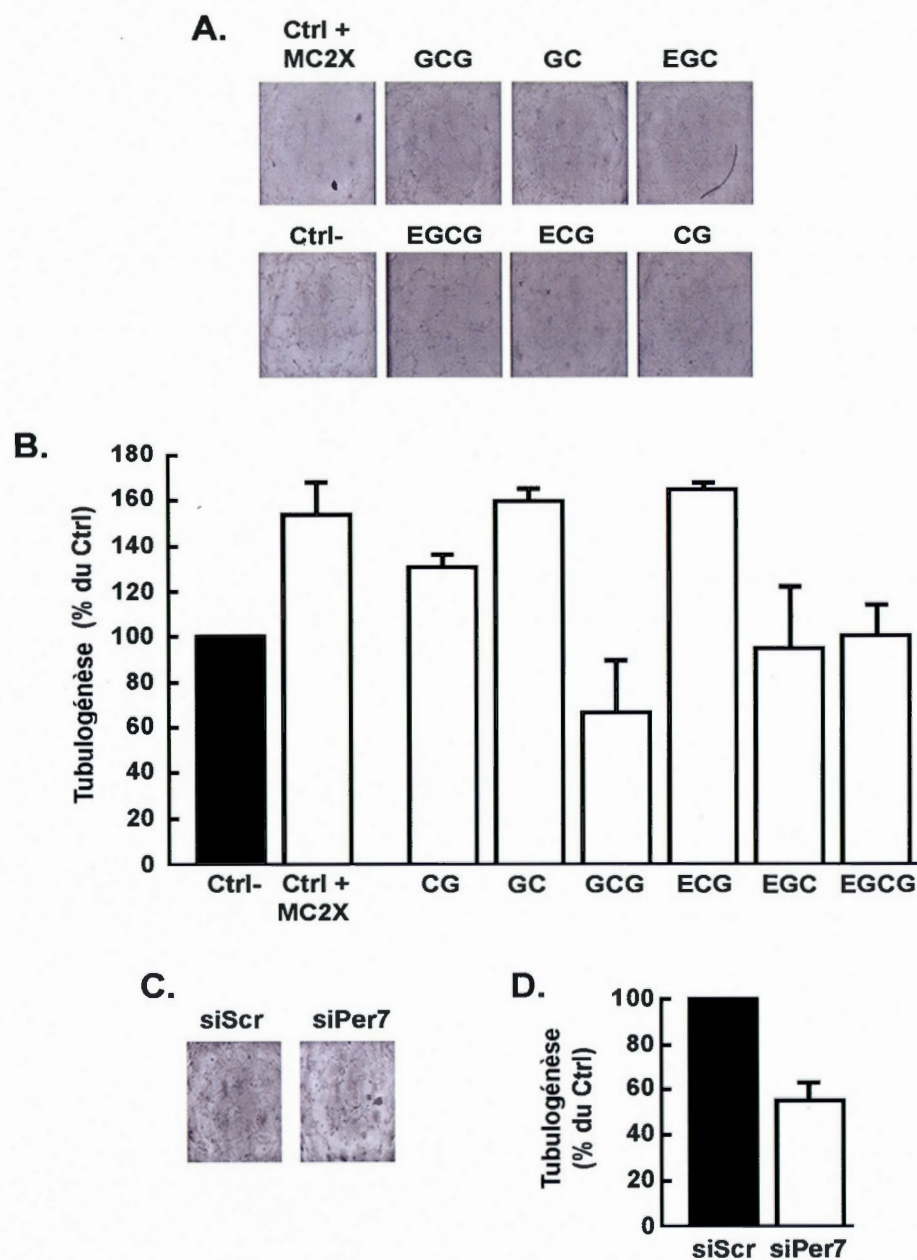


Figure 4.6 Effet de la périostine sur la formation de la tubulogénèse dans les HBMECs. Les cellules U251 ont été prétraitées 18 h avec milieu de culture sans

sérum MC ou avec 25 μ M des catéchines ECG, EGC, EGCG, CG, GC ou GCG (A), ou avec 5 μ M de si-Périostine (C). Par la suite, le milieu de culture conditionné a été récolté, incubé 3 h avec les HBMECsensemencées, et adhérees sur Matrigel (10 000 cellules/ puits). Les photos des structures de type capillaire ont été prises à l'aide d'un microscope à contraste de phase et ont été quantifiées à l'aide du logiciel imageJ (B, D). Les résultats obtenus proviennent de quatre expériences indépendantes, et présentées comme moyennes \pm SEM.

4.8 La périostine comme facteur proangiogénique

Le but de la présente partie est d'évaluer le rôle potentiel de la périostine comme un facteur proangiogénique sur l'induction de la migration du compartiment vasculaire endothélial. En effet, nous remarquons à partir des résultats de la Figure 4.7 A, qu'après 10 h de migration et à la concentration de 25 ng/ml, le VEGF induit la migration avec 26,37 d'indice cellulaire (qui est l'unité arbitraire d'impédance électrique mesurée en temps réel par le RTCA DP), alors que la périostine recombinante, dans les mêmes conditions, induit la migration à 31,28 d'indice cellulaire d'HBMECs.

4.8.1 Les catéchines inhibent la migration induite par la périostine

Afin d'étudier l'effet des différentes catéchines du thé vert sur la migration des cellules endothéliales induite par la périostine sécrétée par le compartiment tumoral, nous avons utilisé de la périostine recombinante. Les cellules HBMECs ont été utilisées comme modèle cellulaire et la migration a été mesurée l'aide du système xCELLigence. Pour cela, nous avons d'abord déterminé la concentration de la périostine recombinante induisant le maximum de migration. Nous avons noté que seule la concentration à 500 ng/ml induisait 76,29 d'indice cellulaire (Figure 4.7 B). De ce fait, les HBMECs ont ensuite été traitées de deux façons distinctes soit avec les différentes catéchines CG, GC, GCG, ECG, EGC, EGCG à 25 μ M, soit avec les mêmes catéchines mais en présence de 500 ng/ml de périostine recombinante. Nous avons constaté que la migration induite par la périostine après 24 h est inhibée de 60 % pour la catéchine EGC, de 52 % pour la catéchine GC, de 43 % pour la catéchine GCG, et de 23 % pour la catéchine EGCG, contrairement aux catéchines CG, ECG, où on observe une absence d'inhibition (Figures 4.7: C- H). À noter ici que l'effet de la périostine seule dans la figure 4.7A est plus important que dans la figure 4.7B pouvant être lié au passage cellulaire

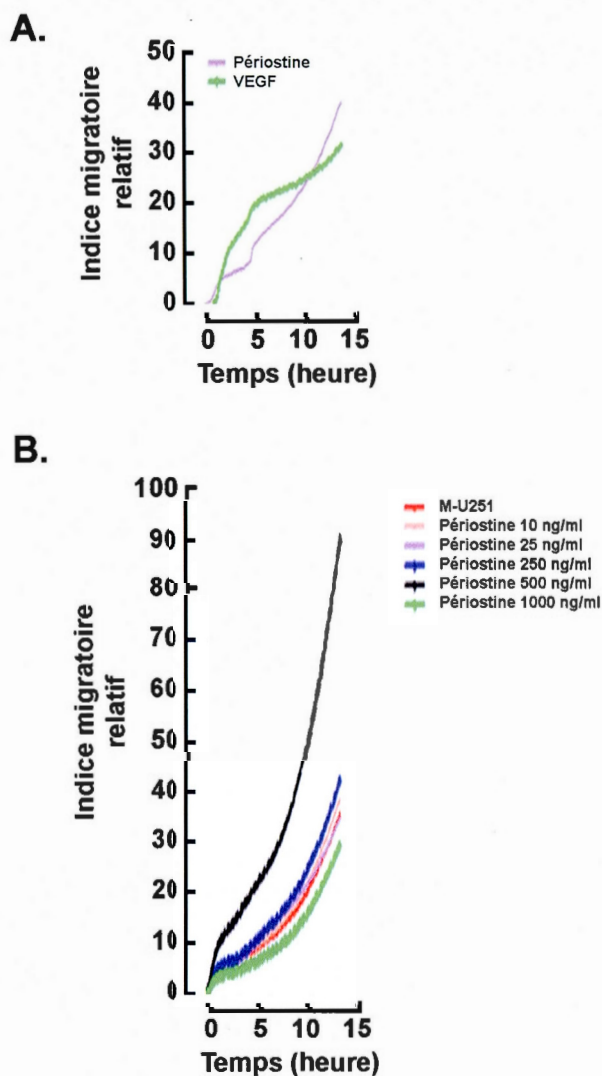


Figure 4.7 (A,B): Impact de la périostine sur la migration des cellules HBMECs et l'effet des catéchines sur l'inhibition de la migration du compartiment endothélial induite par la périostine. L'importance de la périostine comme facteur proangiogénique (25 ng/ml), comparativement au VEGF (25 ng/ml), a été déterminée en premier lieu (A). Un test de concentration-réponse de la périostine recombinante a été effectué afin de déterminer la concentration idéale permettant d'induire le maximum de migration dans les HBMECs, le milieu sans sérum des U251 (M-U251)

a été utilisé comme un contrôle négatif (B). Pour voir l'effet des catéchines sur la migration des HBMECs, les cellules ont été traitées avec 25 μ M de catéchines ou en présence de la périostine recombinante (CG/ CG+ 500 ng/ml du recombinant) (C), (GC/ GC+ 500 ng/ml du recombinant) (D), (GCG/ GCG+ 500 ng/ml du recombinant) (E), (ECG/ ECG+ 500 ng/ml du recombinant) (F), (EGC /EGC+ 500 ng/ml du recombinant) (G), (EGCG/ EGCG+ 500 ng/ml du recombinant) (H). La migration a été mesurée par xCELLigence, et les résultats présentés proviennent d'une expérience représentative.

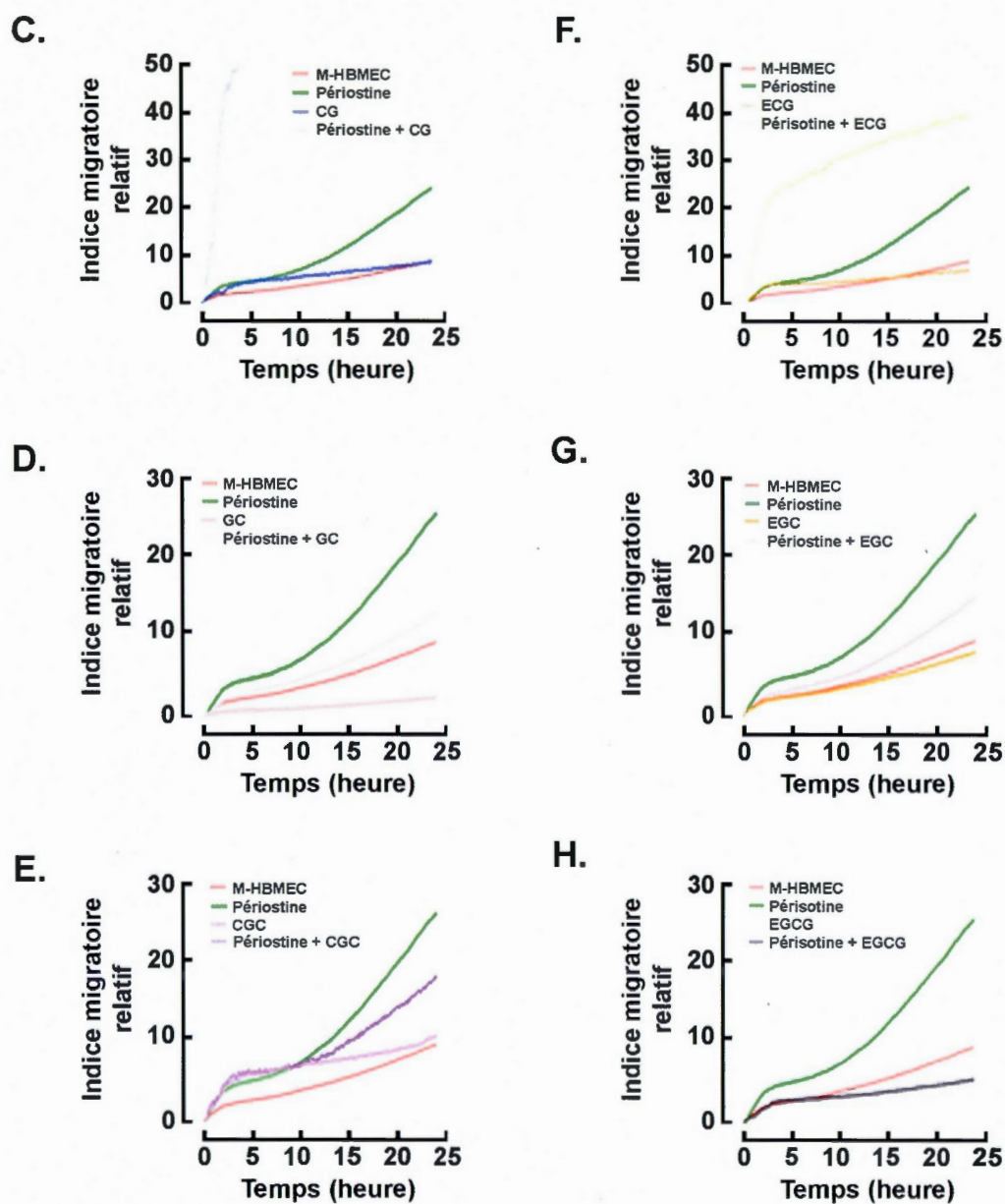


Figure 4.7 (C-H) : Impact de la périostine sur la migration des cellules HBMECs et l'effet des catéchines sur l'inhibition de la migration du compartiment endothélial induite par la périostine. Pour voir l'effet des catéchines sur la migration des

HBMECs, les cellules ont été traitées avec 25 μ M de catéchines ou en présence de la périostine recombinante (CG/ CG+ 500 ng/ml du recombinant) (C), (GC/ GC+ 500 ng/ml du recombinant) (D) ,(GCG/ GCG+ 500 ng/ml du recombinant) (E), (ECG/ ECG+ 500 ng/ml du recombinant) (F), (EGC /EGC+ 500 ng/ml du recombinant) (G), (EGCG/ EGCG+ 500 ng/ml du recombinant) (H). La migration a été mesurée par xCELLigence, et les résultats présentés proviennent d'une expérience représentative.

4.9 Effets des catéchines sur la phosphorylation de ERK induite par la périostine

Plusieurs études ont démontré que l'activation de la protéine Erk par phosphorylation est importante dans l'induction de la migration. Comme nous constatons une corrélation positive entre la périostine et l'induction de la migration, nous avons donc évalué l'effet des catéchines du thé vert sur l'inhibition de la voie de signalisation ERK induite par la périostine dans les HBMECs. Tout d'abord, la phosphorylation de la protéine ERK a été évaluée en réponse au milieu de culture conditionné provenant du compartiment tumoral sur un intervalle allant jusqu'à 120 min. Pour ce faire, nous avons sévré les cellules U251 pendant 18 h et récolté le surnageant. Le milieu de culture conditionné a été par la suite utilisé afin de stimuler les HBMECs. Nous avons constaté qu'à 15 min, la phosphorylation de Erk était induite avec un facteur de deux par rapport au contrôle, tandis qu'à 30 min une induction de plus de trois fois a été constatée (Figure 4.8 A).

Par ailleurs, et afin de déterminer l'importance de la périostine dans l'induction de la phosphorylation de la protéine ERK, nous avons stimulé les HBMECs pendant 15 min avec des concentrations croissantes de la périostine recombinante (Figure 4.8 B). Les résultats obtenus indiquent qu'à la concentration de 500 ng/ml, la phosphorylation de la protéine ERK est neuf fois plus élevée par rapport au contrôle. De plus, dans le but de situer l'effet des catéchines sur la phosphorylation de ERK, potentiellement induite par la périostine sécrétée par le compartiment tumoral, nous avons stimulé les HBMECs avec un milieu de culture conditionné provenant des cellules U251 prétraitées pendant 18 h avec les catéchines CG, GC, GCG, ECG, EGC et EGCG (Figure 4.8 C). Nous avons remarqué qu'en présence du milieu de culture conditionné prétraité avec ECG et EGCG, des diminutions du niveau de phosphorylation de ERK de plus de 85 %, de ~70 % avec EGC, GCG, et de ~50 % avec CG et GC ont été observées (Figure 4.8 C). Cependant, nous ne pouvons lier cet effet uniquement qu'à la périostine sécrétée par les cellules

tumorales, du fait que l'effet inhibiteur observé n'est pas seulement dû à une inhibition de la périostine, et que les catéchines pourraient inhiber plusieurs facteurs stimulant la phosphorylation de ERK.

A.

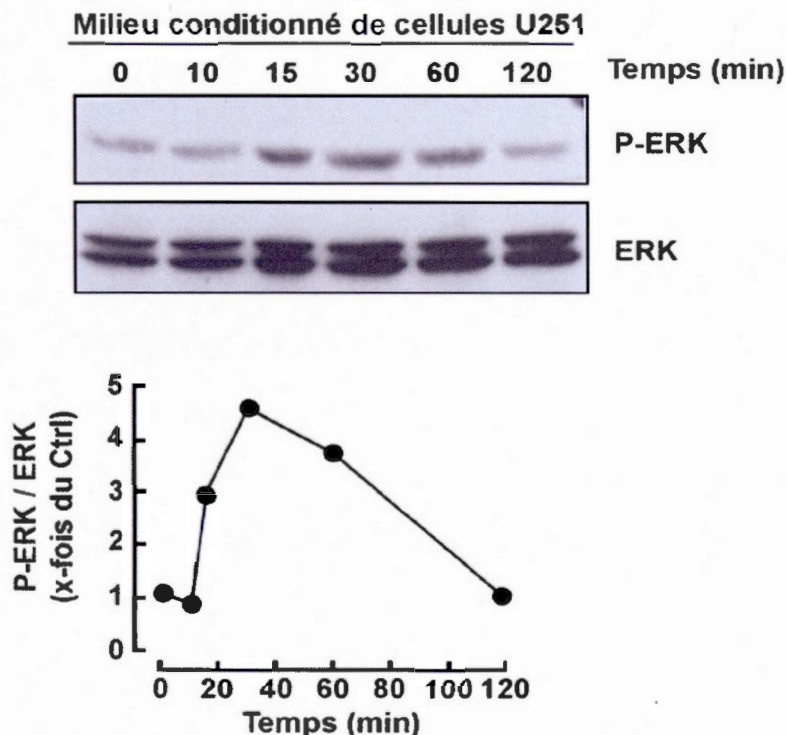


Figure 4.8 A Relation entre la périostine et l'induction de la signalisation cellulaire par la voie ERK. Les cellules U251 ont étéensemencées pendant 48 h, puis sevrées ou traitées avec 25 μ M de catéchines CG, GC, GCG, ECG, EGC, EGCG dans un milieu sans sérum pendant 18 h. Le milieu de culture conditionné a été récolté et les HBMECs ont été stimulées par ce dernier pendant différents temps (0-120 min). Par la suite, nous avons effectué une lyse cellulaire, une électrophorèse et une immunodétection. Les résultats sont présentés par le ratio P-ERK/ERK et proviennent d'une seule expérience.

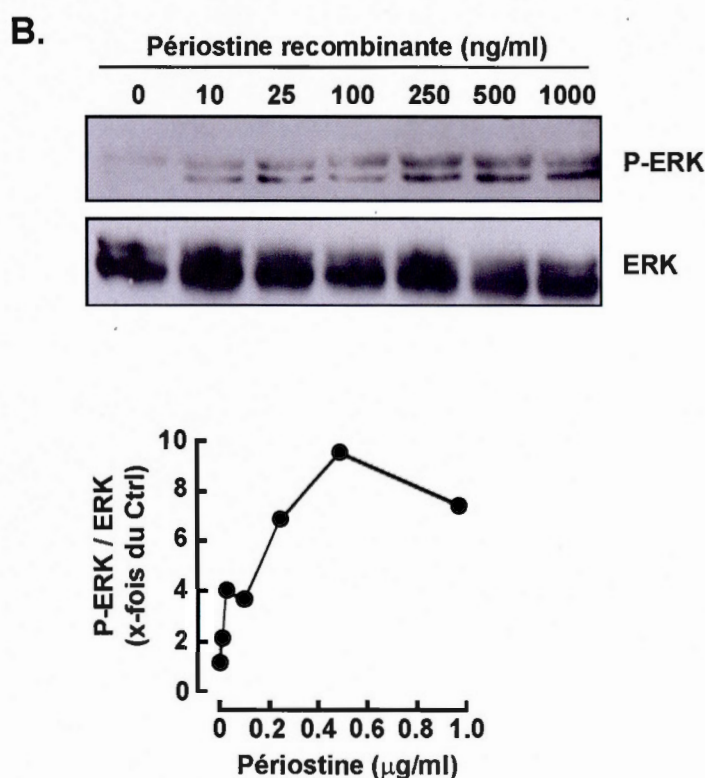


Figure 4.8 B Relation entre la périostine et l'induction de la signalisation cellulaire par la voie ERK. Les cellules U251 ont étéensemencées pendant 48 h, puis sevrées ou traitées avec 25 μ M de catéchines CG, GC, GCG, ECG, EGC, EGCG dans un milieu sans sérum pendant 18 h. Le milieu de culture conditionné a été récolté et les HBMECs ont été stimulées par ce dernier pendant par des concentrations croissantes de la périostine recombinante (C). Par la suite, nous avons effectué une lyse cellulaire, une électrophorèse et une immunodétection. Les résultats sont présentés par le ratio P-ERK/ERK et proviennent d'une seule expérience.

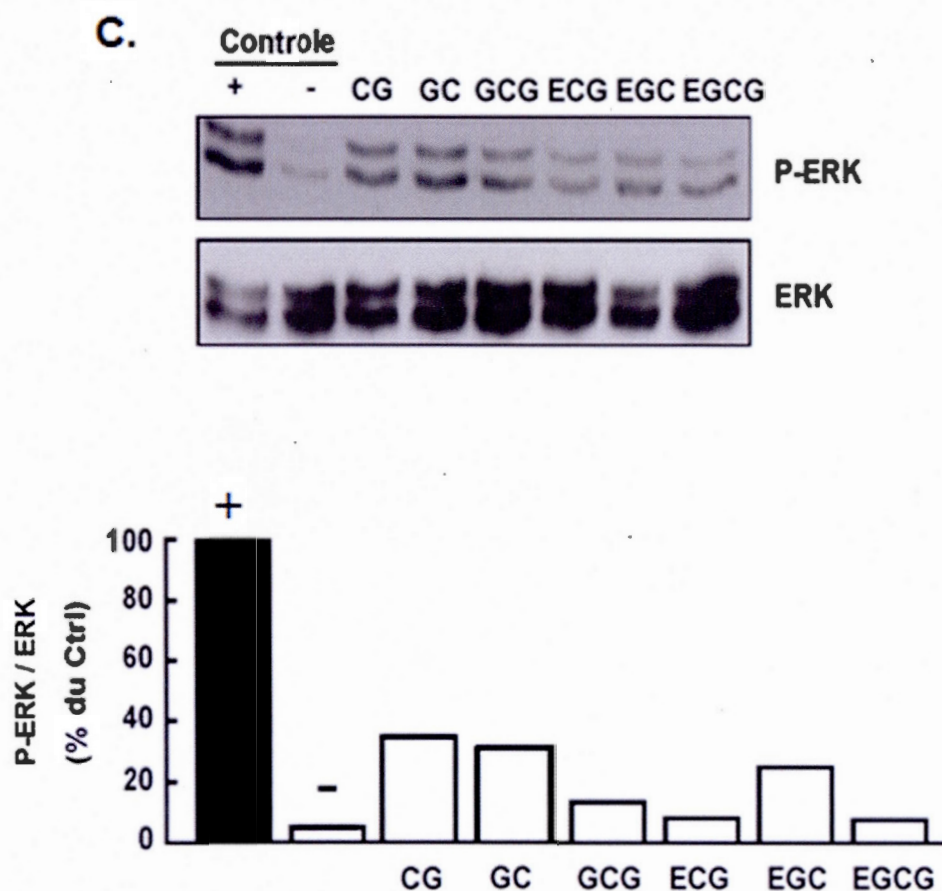


Figure 4.8 C Relation entre la périostine et l'induction de la signalisation cellulaire par la voie ERK. Les cellules U251 ont étéensemencées pendant 48 h, puis sevrées ou traitées avec 25 μ M de catéchines CG, GC, GCG, ECG, EGC, EGCG dans un milieu sans sérum pendant 18 h. Le milieu de culture conditionné a été récolté et les HBMECs ont été stimulées par ce dernier pendant 15 min (B). Par la suite, nous avons effectué une lyse cellulaire, une électrophorèse et une immunodétection. Les résultats sont présentés par le ratio P-ERK/ERK et proviennent d'une seule expérience.

CHAPITRE V

DISCUSSION

Le cancer est une maladie suscitant un énorme intérêt des chercheurs désirant arriver à des solutions thérapeutiques efficaces. Particulièrement, un intérêt grandissant s'est manifesté envers une intervention qui agirait en amont des processus pathologiques impliqués. En effet, les traitements actuellement disponibles et ciblant deux des étapes les plus importantes de la cancérogenèse, soit l'angiogenèse et la métastase, sont encore peu efficaces et associés à des effets secondaires non négligeables. De ce fait, il serait donc intéressant d'envisager la piste de la prévention plutôt que le traitement de la maladie installée. Dans cette optique, plusieurs études épidémiologiques ont démontré l'importance des polyphénols du thé vert dans la prévention du cancer, et ce, grâce à leur grand potentiel inhibiteur des processus de la cancérogenèse (Ju *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009; Tachibana, 2011). Cependant, leurs mécanismes d'action moléculaire sont peu approfondis. C'est dans ce même contexte que se situe notre étude visant à déterminer en premier lieu, dans les glioblastomes, le niveau d'expression intracellulaire et extracellulaire de la périostine dont la propriété métastatique a été récemment découverte (Mikheev *et al.*, 2014). D'autres objectifs ont également été fixés en l'occurrence, de caractériser l'effet de différentes catéchines sur le niveau de sécrétion ainsi que sur l'expression génique et protéique de la périostine dans les cellules de glioblastomes U251, et de préciser leur impact sur les aspects cellulaires induits par la périostine sécrétée par le compartiment tumoral sur la tubulogenèse, la migration cellulaire, ainsi que sur la signalisation cellulaire impliquant la voie ERK au niveau du compartiment endothélial.

Nos principaux résultats démontrent que la synthèse et la sécrétion de la périostine sont plus importantes dans les cellules U251 de glioblastomes, et que les catéchines EGCG, CG, GCG, ECG, GC et EGC présentait un effet inhibiteur significatif sur la sécrétion, que l'EGCG, l'EGC, la GCG, et la GC présentait plutôt un effet inhibiteur sur l'expression protéique, alors que l'EGCG, la CG, la GCG et l'ECG présentait un effet inhibiteur au niveau génique. Au niveau cellulaire, nous avons également mis en évidence les propriétés antiangiogéniques du milieu de culture conditionné des cellules tumorales U251 prétraitées, soit avec un ARN interférant (si-Périostine), soit avec la catéchine GCG. De plus, nous démontrons que la périostine recombinante induisait la migration des cellules endothéliales HBMECs et que les catéchines EGC, GC, GCG et EGCG inhibent cette migration. Au niveau moléculaire, nos résultats supportent un rôle de la périostine dans l'induction de la phosphorylation de la protéine ERK et les effets inhibiteurs de cette induction par les catéchines CG, GC, GCG, ECG, EGC et EGCG.

5.1 Expression de la périostine dans différentes lignées cellulaires

Parmi les cellules que nous avons testées, nous avons validé les cellules U251, dérivées d'un glioblastome humain, comme modèle cellulaire à utiliser pour la présente étude. Cette lignée présentait un niveau d'expression important de la périostine intracellulaire et extracellulaire. À noter que certains facteurs transcriptionnels peuvent être à l'origine de cette différence d'expression de la périostine au niveau de certains types cellulaires. Tel est le cas du Yin Yang-1 qui est exprimé dans les cellules U251 (Yin *et al.*, 2013) et U87 (Li *et al.*, 2011), alors qu'aucune étude n'a démontré son expression dans les cellules U138. Une certaine hétérogénéité quant à l'origine tissulaire du prélèvement au sein de la tumeur serait aussi envisageable.

Par ailleurs, nous avons noté une différence dans le poids moléculaire de la périostine intracellulaire entre les deux lignées cellulaires U-138 et U-251. Cela pourrait être expliqué par la présence de deux différents isoformes de la périostine dû probablement aux différents épissages alternatifs de l'ARNm de la périostine. En effet, dans le cancer de la thyroïde il a été noté la présence de huit isoformes de la périostine dans le même tissu (Bai *et al.*, 2011).

5.2 Effet des catéchines sur l'expression de la périostine au niveau du compartiment tumoral

Dans une seconde étape, nous avons caractérisé pour la première fois l'effet inhibiteur de certaines catéchines du thé vert sur le niveau d'expression de la périostine extracellulaire. Cet effet peut atteindre plus de 50 % avec les catéchines CG, GCG voire 100% avec EGCG et pourrait être lié à la structure même des catéchines. En effet, des études antérieures de structures-fonctions ont lié la présence de liaisons ester à l'inhibition de l'activité «chymotryptic-like» de la sous-unité 20S du protéasome. Cette inhibition résulte dans plusieurs tumeurs en une accumulation de deux substrats naturels du protéasome P 27^{Kip1}, I κ B- α , suivit d'un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Nam *et al.*, 2001). À noter que cette étude a démontré un effet inhibiteur pour la catéchine ECG, effet non retrouvé au niveau protéique dans notre étude. Par ailleurs, d'autres études ont notamment lié la présence du groupement gallate dans les catéchines inhibitrices précédentes, à leurs pouvoirs antioxydants et anti-invasifs (Zaveri, 2006; Annabi *et al.*, 2007).

Nous avons aussi élargi notre étude au niveau génique, afin d'évaluer l'effet inhibiteur des catéchines sur la transcription de la périostine, et nous avons noté la présence d'une inhibition de plus de 30 % par les catéchines ECG, GCG, CG et EGCG, mais pas avec l'EGC et la GC. À ce titre, notons que le promoteur de la périostine contient un site de liaison à l'AP-1 (Activateur de la Protéine -1) (Hakouno

et al., 2010), et qu'il a déjà été démontré que l'EGCG inhibait les fonctions de la protéine AP-1 associées au caractère métastatique et invasif des cellules cancéreuses (Crawford et Matrisian, 1996). De plus, des études antérieures avaient démontré que [³H] EGCG était en mesure de se localiser dans le cytosol, ainsi que dans le noyau. Cette internalisation pourrait être due à la liaison de l'EGCG à son récepteur membranaire 67kb-LR (Okabe *et al.*, 1997). Ainsi, l'EGCG pourrait donc inhiber indirectement l'expression génique de la périostine en inhibant AP-1 dans les gliomes. Il se peut également que l'inhibition transcriptionnelle de la périostine soit due aux fonctions épigénétiques de l'EGCG sur les chromosomes (Fang, *et al.*, 2007). Cela pourrait être lié à un déficit dans la méthylation au niveau des îlots CpG causant une régulation à la baisse des processus physiologiques et de la prolifération cellulaire. EGCG inhiberait aussi l'ADN méthyltransférase (DNMT) qui renverse la méthylation induisant l'inhibition de l'expression génique (Fang *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'origine de cette inhibition pourrait être liée à la fonction de l'EGCG sur l'hypométhylation du gène humain de la telomerase reverse transcriptase (hTERT) et cela en inhibant l'activité d'une histone désacétylase (HDAC) et d'une histone acétyltransférase (HAT). La déméthylation de hTERT cause une inhibition transcriptionnelle du hTERT, et de ce fait réprime la progression tumorale. Ces résultats ont été validés en traitant les cellules MCF-7, exprimant les récepteurs aux estrogènes (ER +) et MDA-MB-231 (ER -) du cancer du sein par EGCG ainsi qu'avec un nouveau produit purifié nommé pEGCG plus stable que EGCG (Meeran *et al.*, 2011). Il faut noter qu'aucune étude n'a encore démontré le rôle exact de l'EGCG sur l'inhibition de l'expression génique de la périostine, de même que le rôle des autres catéchines. Il faut noter par ailleurs que la périostine appartient à la famille des protéines vitamine K-dépendantes. Le milieu de culture utilisé ici ne contenait pas cette vitamine, ce qui pourrait laisser conclure que le rôle de la périostine dans cancérogenèse n'est pas liée à sa modification post-tradictionnelle I.E carboxylation de ses résidus d'acide glutamique.

Enfin, au niveau intracellulaire, nos résultats indiquent que seule la catéchine EGCG inhibait l'expression protéique de la périostine de ~90 % alors que l'EGC, la GCG et la GC l'inhibaient de ~70 %. D'une manière structure-fonction, notons que les catéchines précédentes contiennent toutes un groupement hydroxyle dans le radical R₁, ce qui pourrait être lié à leur capacité inhibitrice. Toutefois, les effets observés pourraient aussi être attribuables à leurs métabolites ou alors à d'autres produits du métabolisme. En effet, l'EGCG produit des espèces réactives à l'oxygène parmi eux nous citons le peroxyde d'hydrogène, qui peut agir comme un second messenger afin de réguler certaines voies de signalisation en aval (Elbling *et al.*, 2005). Cette action peut être médiée par une action directe au niveau de la surface cellulaire (Kim *et al.*, 2014). De plus, l'inhibition de l'expression protéique de la périostine pourrait être liée à l'effet inhibiteur des catéchines sur la glycosidase II dans les microsomes, effet également trouvé dans les cellules hépatiques murines (Gamberrucci *et al.*, 2006).

Nous avons également démontré que les catéchines EGCG et CG ont un mécanisme d'action semblable à celui de la bréfeldine A, bloquant ainsi probablement le trafic vésiculaire de la périostine du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi (Jackson, 2000). Par ailleurs, il a été déjà démontré que l'EGCG a un effet inhibiteur sur l'expression génique du RhoA, cette dernière joue un rôle dans la réorganisation du cytosquelette cellulaire ce qui pourrait expliquer l'inhibition du trafic vésiculaire de la périostine par l'EGCG (Annabi *et al.*, 2005).

5.3 Concentration-réponse des catéchines les plus efficaces sur la sécrétion de la périostine

Notre étude suggère que l'inhibition de la sécrétion de la périostine par les catéchines du thé vert est concentration dépendante, et que les IC₅₀ sont entre 3,7 et

9,5 μM ce qui les rend proches des concentrations plasmatiques (Manach *et al.*, 2004). En effet, après consommation d'une tasse de thé vert, contenant 100 à 200 mg de EGCG, les concentrations plasmatiques de cette catéchine avoisinent les 10 μM (Zeng *et al.*, 2014).

5.4 La périostine sécrétée par le compartiment cellulaire tumoral induit la tubulogenèse du compartiment cellulaire endothélial

Nous avons caractérisé les propriétés proangiogéniques de la périostine dans un modèle cellulaire endothélial cérébral HBMECs. La répression de la périostine entraînait une inhibition de 30 % de la tubulogenèse, alors que la stimulation des mêmes cellules avec un milieu de culture conditionné par les cellules U251 induisait la tubulogenèse de ~65 %. En effet, ce dernier contient plusieurs facteurs proangiogéniques sécrétés par le compartiment tumoral, dont la périostine. Une étude a démontré que le milieu de culture conditionné provenant des chéloïdes, anomalie de la cicatrisation cutanée correspondant à une prolifération du tissu dermique dense, induisait la tubulogenèse des HUVECs, alors que la répression de la périostine inhibait la tubulogenèse dans ces mêmes cellules. De plus, la même étude a démontré l'induction de la tubulogenèse d'une manière concentration dépendante, et cela suite à l'usage de périostine recombinante (Zhang *et al.*, 2015).

De plus, plusieurs études ont démontré l'implication de la périostine dans l'induction de l'angiogenèse tumorale dans le cancer du poumon et le cancer du sein. Cette induction requiert une régulation positive du VEGFR-2 (Shao *et al.*, 2004). Dans le carcinome à cellules squameuses de la tête et du cou, la surexpression de la périostine corrèle avec une augmentation de la régulation du VEGF-C induisant ainsi la tubulogenèse *in vitro* des cellules endothéliales (Kudo *et al.*, 2012). Dans le cancer de l'estomac aussi, la surexpression de la périostine, dans des conditions d'hypoxie, contribue fortement à son caractère proangiogénique et cela en passant par la

régulation positive du VEGF (Qiu *et al.*, 2013). Certes, quelques études ont porté sur le rôle de la périostine dans le processus de la tubulogenèse. Cependant, aucune d'entre elles n'a abordé l'effet des différentes catéchines du thé vert sur ce processus d'où l'intérêt de notre étude.

Par ailleurs, nous avons trouvé un effet inhibiteur de la catéchine GCG sur la tubulogenèse induite par la périostine. La stimulation de la tubulogenèse des cellules HBMECs par le milieu de culture conditionné provenant des cellules U251 prétraitées avec GCG, est inhibée. Il semble que cela soit lié à l'effet inhibiteur de cette catéchine sur la sécrétion de la périostine. Notons également que cet effet n'est pas lié à l'effet direct de la molécule sur la tubulogenèse car la demi-vie des catéchines est d'un maximum de 5 h, alors que dans la présente étude les traitements avec les catéchines étaient de 18 h (Aluko, 2012).

5.5 La périostine comme facteur proangiogénique et effets des catéchines sur la migration induite par la périostine

La migration des cellules endothéliales constitue l'un des processus primordiaux de l'angiogenèse tumorale. De ce fait, nous avons démontré que la périostine était un facteur proangiogénique dans les glioblastomes, confirmant certaines études qui l'ont démontré dans d'autres types de cancers (Takanami *et al.*, 2008). Par la suite, l'effet des catéchines sur cette induction a été évalué. En effet, une dégradation incontrôlée de la matrice extracellulaire par les métalloprotéinases est associée au caractère invasif et migratoire des tumeurs, et la surexpression des MMP-2/9 a été observée dans plusieurs types de cancers (Yang *et al.*, 2013). Il a été également documenté que la voie de signalisation ERK régule à la hausse l'expression des MMPs dans le cancer de la prostate (Yang *et al.*, 2013), et que la périostine induisait l'expression protéique de MMP-2 et VEGF via $\alpha v \beta 3$ et la voie de signalisation ERK dans les ligaments parodontaux (Watanabe *et al.*, 2012). De ce fait,

l'effet observé de la périostine recombinante sur l'induction de la migration pourrait être lié à la régulation à la hausse de la MMP-2 et donc à la migration cellulaire via l'intégrine $\alpha\beta3$ et la voie de signalisation ERK. De plus, la présence du groupement gallate en position 3, en particulier, a été incriminée dans l'inhibition de manière efficace, temps et concentration dépendants, de la sécrétion de MMP-9, processus corrélé avec l'acquisition du phénotype invasif d'une tumeur. Le mécanisme d'inhibition implique la déstabilisation de la transcription de MMP-9 par une réduction de gène et l'expression protéique de la MMP-9 et l'ARNm stabilisant le facteur nucléaire HuR (Annabi *et al.*, 2007).

Un autre aspect original de notre travail, est l'étude de l'effet des catéchines sur le processus migratoire induit par la périostine. En effet, nous avons constaté qu'à la même concentration, le VEGF ainsi que la périostine, induisait la migration des cellules endothéliales HBMECs, confirmant ainsi le caractère angiogénique de la périostine. Ce sont les catéchines EGC, GC, GCG et EGCG qui inhibent la migration induite par la périostine recombinante. Notons cependant, que l'EGCG seule affectait le niveau basal de la migration et cela pourrait être dû à son effet inhibiteur sur les fonctions d'autres facteurs inducteurs de la migration cellulaire tel que pour le récepteur VEGFR-2 (Lamy *et al.*, 2002). En effet, une étude antérieure avait démontré que les catéchines ECG, CG et EGCG, inhibaient de manière concentration dépendante la phosphorylation de la tyrosine de VEGFR-2 induite par le VEGF. Cette inhibition était identique à celle provoquée par le Semaxanib (SU5416), médicament inhibiteur spécifique du VEGFR-2. Notons que cet effet n'a pas été retrouvé avec les autres catéchines testées (Lamy *et al.*, 2002). Une autre étude avait aussi retrouvé cet effet exercé particulièrement par EGCG qui inhibait l'angiogenèse induite par le VEGF, et ce, en inhibant la tubulogenèse des cellules endothéliales bovines *in vitro* et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans le modèle CAM de poussin (Cao *et Cao*, 1999).

5.6 Rôle de la périostine dans la phosphorylation de ERK et effets des catéchines sur l'inhibition de cette induction

Suite aux résultats précédents, il semble que la périostine sécrétée par le milieu tumoral soit responsable de la régulation à la hausse de la tubulogénèse du compartiment endothélial, une étape importante dans le processus de la tumorigénèse. Les mécanismes moléculaires intimement responsables des propriétés proangiogéniques de la périostine dans les glioblastomes restent, à l'heure actuelle, peu compris. Une étude a démontré le rôle de la périostine dans les chéloïdes où elle induirait la migration et la tubulogénèse des cellules endothéliales HUVECs en activant la phosphorylation de la protéine ERK (Zhang *et al.*, 2015). Nos résultats paraissent concordants avec cette étude puisque la périostine recombinante induisait la phosphorylation de ERK des cellules HBMECs que nous avons traitées.

Par ailleurs, la stimulation *in vitro* des cellules HBMECs avec le milieu de culture conditionné provenant des cellules U251 prétraitées avec différentes catéchines, démontre une inhibition de la phosphorylation de la protéine ERK induite par la périostine. Cela semble être lié soit à l'effet inhibiteur de certaines catéchines telles l'EGCG, la CG, la GCG, la GC, et l'ECG sur la sécrétion de la périostine, soit à l'effet inhibiteur indirect des catéchines EGC sur d'autres facteurs proangiogéniques tels le VEGF. Notons également que cette catéchine était responsable de l'inhibition de la migration des cellules endothéliales HBMECs. De plus, dans le cancer du sein, il semble que l'EGCG inhibe l'expression génique des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et cela a été corrélé à un éventuel empêchement de formation d'hétérodimères de ces intégrines au niveau de la surface cellulaire, inhibant ainsi la liaison avec leurs ligands cellulaires respectifs et interférant avec l'action médiée des intégrines sur l'action et la fonction de MMP-2 (Sen *et al.*, 2009).

De ce fait, nous pouvons conclure que cet effet est simplement lié à la régulation à la baisse de la périostine suite au traitement avec les catéchines qui a induit à la fois une diminution de la phosphorylation de ERK. Concluons enfin qu'il semble que la périostine induise la migration et la tubulogenèse des HMBECs en activant la voie ERK. De plus, notons que les catéchines du thé vert semblent avoir un effet inhibiteur sur les propriétés proangiogéniques de la périostine dans les glioblastomes, ce qui pourrait être une voie vers la prévention tumorale via la consommation de thé vert.

Nous avons tenté de résumer à la Figure 5.1 le mode d'action possible des catéchines du thé vert, en particulier l'EGCG sur la régulation de la périostine. Ces molécules peuvent agir à plusieurs niveaux:

- au niveau génique dans les cellules tumorales : La transcription de la périostine peut être inhibée par la catéchine EGCG en particulier, et ce, par le biais de son effet inhibiteur sur l'AP-1.
- au niveau microsomal: L'effet inhibiteur des catéchines sur la glycosidase II dans les microsomes serait à l'origine de l'inhibition de l'expression protéique de la périostine.
- au niveau de l'angiogenèse induite par la périostine : Celle-ci peut aussi être inhibée. La périostine sécrétée par les cellules tumorales va se lier aux intégrines des cellules endothéliales ($\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$) stimulant ainsi plusieurs voies de signalisation. L'EGCG pourrait avoir un effet inhibiteur sur les intégrines $\alpha v \beta 3$, empêchant ainsi l'activation de la phosphorylation de la protéine ERK. L'EGCG pourrait aussi inhiber l'expression des MMPs et par conséquent inhiber la migration induite par ces dernières dans le compartiment endothélial.

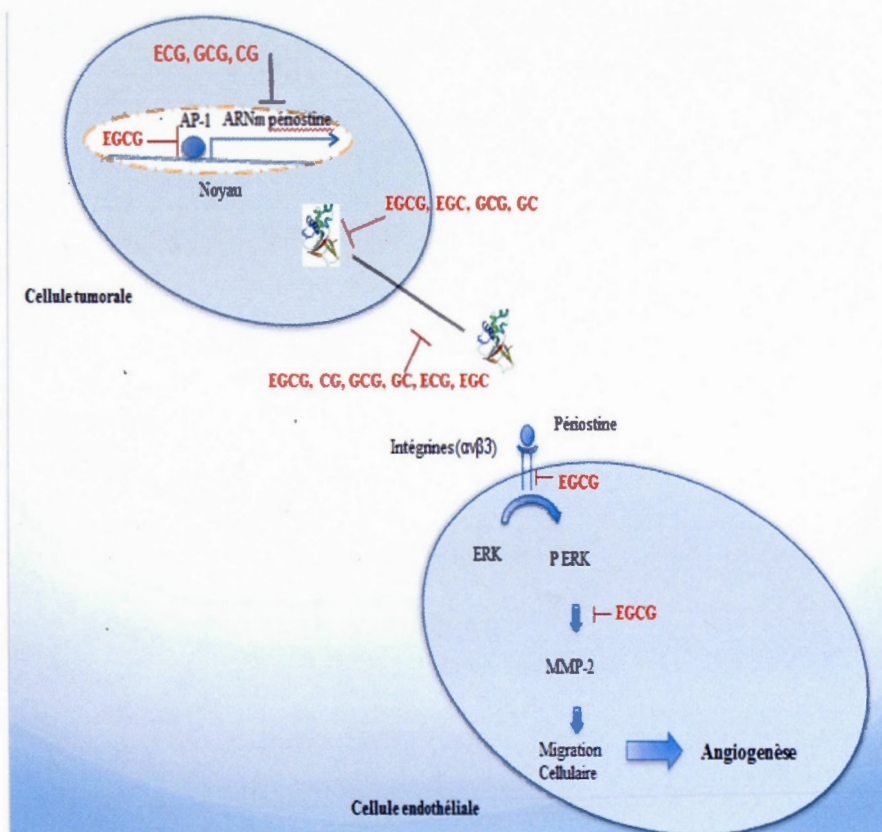


Figure 5.1 Rôle potentiel de la catéchine EGCG sur la périostine

CHAPITRE VI

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

6.1 CONCLUSION

Les gliomes font l'objet de recherches pointues dont l'objectif principal est d'éclaircir les mécanismes oncogéniques en jeu, et ce, afin de proposer des thérapies plus ciblées. Les défis lancés pour combattre cette maladie ne sont pas des moindres, du fait de la complexité de la pathologie et de la gravité de son pronostic. Les dernières recherches s'investissent, de ce fait, davantage dans des stratégies basées sur la prévention et l'intervention en amont de la maladie, tout en maintenant l'amélioration et l'exploration d'éventuelles pistes thérapeutiques. La nutrathérapie et la prévention par un contrôle de l'hygiène de vie notamment par le recours à une alimentation saine et équilibrée, constituent des pistes intéressantes et ouvrent des horizons prometteurs dans le but d'inhiber le développement des cellules tumorales.

Les principaux résultats de notre recherche mettent en évidence que parmi les trois lignées cellulaires gliales, seule la lignée U251 exprimait la périostine au niveau intracellulaire et extracellulaire et qu'elle pouvait être inhibée par les catéchines du thé vert. La périostine sécrétée dans le milieu extracellulaire est bien connue pour son rôle inducteur de métastases dans plusieurs types de cancers. Un effet inhibiteur sur l'angiogenèse tumorale induite par la périostine a aussi été identifié. Ainsi, les catéchines du thé vert pourraient être proposées comme une stratégie de prévention contre le cancer du cerveau.

6.2 Perspectives

Afin d'approfondir notre étude, il serait intéressant de procéder à l'investigation d'autres voies de signalisation, et ce, afin de mieux cerner le mécanisme moléculaire exact, responsable de l'induction de la migration via la périostine.

En outre, et dans le but d'évaluer l'impact de l'inhibition directe de la périostine sur les différentes voies de signalisation induites par cette dernière, nous proposons de réaliser une transfection des cellules U251 avec un ARN interférant et nous procéderons à la récolte du milieu et stimulation du compartiment endothélial afin d'investiguer la voies de signalisation FAK. Ce choix est justifié par le fait qu'il a été récemment démontré le rôle de la périostine sur la migration et la tubulogenèse dans les HUVECs via l'activation entre autres de la voie de signalisation FAK dans les fibroblastes de chéloïdes (Zhang *et al.*, 2015).

De plus, afin d'élargir le champ de l'étude dans le futur, il serait intéressant:

- de bloquer les intégrines avec un anticorps neutralisant et cela afin de voir les voies de signalisation induites par la périostine, et si celles-ci sont inhibées par les diverses catéchines.
- d'évaluer le potentiel synergique entre deux facteurs proangiogéniques, la périostine et le VEGF *in vitro*, et cela au niveau de la migration des cellules endothéliales HBMECs.
- d'évaluer les effets *in vitro* des catéchines sur l'inhibition de l'angiogenèse induite par la périostine dans d'autres types de cancers.

BIBLIOGRAPHIE

Adjakly, M., Ngollo, M., Dagdemir, A., Judes G., Pajon, A., Karsli-Ceppioglu, S., Penault-Llorca, F., Boiteux, J. P., Bignon, Y. J., Guy, L. et Gallon, D. B. (2015). Prostate cancer: The main risk and protective factors – Epigenetic modifications. *Annales Endocrinologie*, 76 (1): 25-41.

Afanador, E., Yokozeki, M., Oba, Y., Kitase, Y., Takahashi, T., Kudo, A. et Moriyama, K. (2005). Messenger RNA expression of periostin and Twist transiently decrease by occlusal hypofunction in mouse periodontal ligament. *Archives of Oral Biology*, 50(12), 1023-31.

Aggarwal, B. B. et Shishodia, S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology*, 71(10), 1397-1421.

Aggarwal, B. B., Shishodia, S., Sandur, S. K., Pandey, M. K. et Sethi, G. (2006). Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochemical pharmacology*, 72(11), 1605-21.

Aguilera, A. et Gomez-Gonzalez, B. (2008). Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nature Reviews Genetics*, 9 (3), 204-17.

Al-Zhoughbi, W., Huang J., Paramasivan, G. S., Till, H., Pichler, M., Guertl-Lackner, B. et Hoefler G. (2014). Tumor Macroenvironment and Metabolism. *Seminars in Oncology*, 41(2), 281–95.

Alford, A. I. et Hankenson, K. D. (2006). Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. *Bone*, 38 (6), 749-57.

Aluko, R.E. (2012). *Functional Foods and Nutraceuticals*. Springer edition.

Annabi, B., Currie J.C., Moghrabi, A. et Béliveau, R. (2007). Inhibition of HuR and MMP-9 expression in macrophage-differentiated HL-60 myeloid leukemia cells by green tea polyphenol EGCg. *Leukemia Research*, 31(9), 1277-84.

Annabi, B., Lachambre, M.P., Bousquet-Gagnon, N., Page, M., Gingras, D., Béliveau, R. (2002) Green tea polyphenol (3)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1542, 209-20.

Bai, Y., Nakamura, M., Zhou, G., Li, Y., Liu, Z., Ozaki, T., Mori, I. et Kakudo, K. (2010). Novel isoforms of periostin expressed in the human thyroid. *Japanese Clinical Medicine*, 1, 13-20.

Balentine, D. A., Wiseman, S. A. et Bouwens, L. C. (1997). The chemistry of tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, 693–704.

Balkwill F. et Mantovani A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357, 539–45.

Bao, S., Ouyang, G., Bai, X., Huang, Z., Ma, C., Liu, M., Shao, R., Anderson, R. M., Rich, J. N. et Wang, X. F. (2004). Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Cell*, 5(4), 329-39.

Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A. F., et Delattre, J. Y. (2003). Primary brain tumours in adults. *Lancet*, 361(9354), 323-31.

Béliveau, R. (2015). Cancer : Le hasard plus que l'hérédité. *Le Journal de Montréal*. 61.

Béliveau, R., et Gingras, D. (2005). *Les aliments contre le cancer. La prévention du cancer par l'alimentation*. Edition Trécarré.

Béliveau, R. et Gingras, D. (2014). *Prévenir le cancer comment réduire les risques. Canada*. TRÉCARRÉ.

Beliveau, R. et Gingras, D. (2007). Role of nutrition in preventing cancer. *Canadian Family Physician*, 53 (11), 1905-11.

Bergers, G. et Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 401-10.

Berrier, A. L. et Yamada, K. M. (2007). Cell-matrix adhesion. *Journal of Cellular Physiology*, 213 (3), 565-73.

Boots, A. W., Haenen, G. R. et Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 585(2-3), 325-37.

Borg, T. K. et Markwald, R. (2007). Periostin: more than just an adhesion molecule. *Circulation Research*, 101 (3), 230-1.

Braicu, C., Lodomery, M.R., Chedea, V.S., Irimie, A. et Berindan-Neagoe, I. (2013). The relationship between the structure and biological actions of green tea catechins. *Food Chemistry*, 141 (3), 3282-89.

Buchler, M. W., Giese, N. A. et Friess, H. (2007). Periostin creates a tumor-

supportive microenvironment in the pancreas by sustaining fibrogenic stellate cell activity. *Gastroenterology*, 132 (4), 1447-64.

Cao, Y., et Cao, R. (1999). Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature*, 398, 381.

Cazaux. C. (2010). L'insatibilité génétique, moteur de l'oncogénèse. *Bulletin du cancer*, 97(11), 1241-51.

Conway, S. J., Izuhara, K., Kudo, Y., Litvin, J., Markwald, R., Ouyang, G., Arron, J. R., Holweg, C. T. et Kudo, A. (2014). The role of periostin in tissue remodeling across health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(7), 1279-88.

Coutu, D. L., Wu, J. H., Monette, A., Rivard, G. E., Blostein, M. D. et Galipeau, J. (2008). Periostin, a member of a novel family of vitamin K-dependent proteins, is expressed by mesenchymal stromal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283 (26), 17991-8001.

Crawford, H.C. et Matrisian, L.M. (1996). Mechanisms controlling the transcription of matrix metalloproteinase genes in normal and neoplastic cells. *Enzyme Protein*, 49, 20-37.

Culav, E. M., Clark, C. H. et Merrilees, M. J. (1999). Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. *Physical Therapy*, 79 (3), 308-19.

Demeule, M., Michaud-Levesque, J., Annabi, B., Gingras, D., Boivin, D. et Jodoin, J., Lamy, S., Bertrand, Y., Béliveau, R. (2002). Green tea catechins as novel antitumor and antiangiogenic compounds. *Current Medicinal Chemistry - Anti-cancer Agents*, 2 (4), 441-63.

Elbling, L., Weiss, R.M., Teufelhofer, O., Uhl, M., Knasmueller, S., Schulte-Hermann, R., Berger, W. et Micksche, M. (2005). Green tea extract and(-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. *The FASEB Journal*, 19 (7), 807-9.

Elledge, S. J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science*, 274 (5293), 1664-72.

Erkan, M., Kleeff, J., Gorbachevski, A., Reiser, C., Mitkus, T., Esposito, I., Giese, T., Fang, M., Chen, D. et Yang, C.S. (2007). Dietary polyphenols may affect DNA methylation. *Journal of Nutrition*, 137 (1), 223S-8S.

Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24, 851-74.

Fang, M. Z., Wang, Y., Ai, N., Hou, Z., Sun, Y., Lu, H., Welsh, W. et Yang, C.S. (2003). Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Research*, 63, 7563-70.

Folkman, J. (2006). Angiogenesis. *Annual Review of Medicine*, 57, 1-18.

Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine*, 1(1), 27-31.

Gamberrucci, A., Konta, L., Collucci, A., Giunti, R., Magyar, J. E., Mandl, J., Banhegyi, G., Bendetti, A. et Csala, M. (2006). Green tea flavonols inhibits glucosidase II. *Biochemical pharmacology*, 72 (5), 640-6.

Gillan, L., Matei, D., Fishman, D. A., Gerbin, C. S., Karlan, B. Y. et Chang, D. D. (2002). Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrins and promotes cell motility. *Cancer Research*, 62 (18), 5358-64.

Gingras, D. et Béliveau, R. (1997). L'angiogenèse tumorales: une nouvelle cible thérapeutique anticancéreuse. *Médecine/Sciences*, 13 (12), 1428-35.

Goetsch, S. C., Hawke, T. J., Gallardo, T. D., Richardson, J. A. et Garry, D. J. (2003). Transcriptional profiling and regulation of the extracellular matrix during muscle regeneration. *Physiological Genomics*, 14 (3), 261-71.

Graf, B. A., Milbury, P. E. et Blumberg, J. B. (2005). Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. *Journal of Medicinal Food*, 8 (3), 281-90.

Haertel-Wiesmann, M., Liang, Y., Fantl, W. J. et Williams, L. T. (2000). Regulation of cyclooxygenase-2 and periostin by Wnt-3 in mouse mammary epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (41), 32046-51.

Hakuno D., Kimura, N., Yoshioka, M., Mukai, M., Kimura, T., Okada, Y., Yozu, R., Shukunami, C., Hiraki, Y., Kudo, A., Ogawa, S. et K. Fukuda. (2010). Periostin advances atherosclerotic and rheumatic cardiac valve degeneration by inducing angiogenesis and MMP production in humans and rodents. *The Journal of Clinical Investigation*, 120 (7), 2292-306.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100 (1): 57-70.

Hollman, P. et Katan, M. (1997). Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 51(8), 305-10.

Horiuchi, K., Amizuka, N., Takeshita, S., Takamatsu, H., Katsuura, M., Ozawa, H., Toyama, Y., Bonewald, L. F. et Kudo, A. (1999). *Journal of Bone and Mineral Research*, 14 (7), 1239-49.

Hussain, S. P., Hofseth, L. J. et Harris, C. C. (2003). Radical causes of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(4), 276-85.

Hwang, E. Y., Jeong, M. S., Park, E. K., Kim, J. H. et Jang, S. B. (2014). Structural characterization and interaction of periostin and bone morphogenetic protein for regulation of collagen cross-linking. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 449(4), 425-31.

Jackson, C.L. (2000). Brefeldin A revealing the fundamental principles governing membrane dynamics and protein transport. *Subcellular Biochemistry*, 34, 233-72.

Ju, J., Lu, G., Lambert, J. D. et Yang CS (2007). Inhibition of carcinogenesis by tea constituents. *Seminars Cancer Biology*, 17(5), 395-02.

Juge, N., Mithen, R. F. et Traka, M. (2007). Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64 (9), 1105-27.

Jung Y.J., Isaacs J.S., Lee S., Trepel J. et Neckers L. (2003). IL-1 β -mediated up-wcritical link between inflammation and oncogenesis. *The FASEB Journal*, 17, 2115-17.

Kashima, T. G., Nishiyama, T., Shimazu, K., Shimazaki, M., Kii, I., Grigoriadis, A. E., Fukayama, M. et Kudo, A. (2009). Periostin, a novel marker of intramembranous ossification, is expressed in fibrous dysplasia and in c-Fos overexpressing bone lesions. *Human Pathology*, 40 (2), 226-37.

Kerbel, R. S. et Kamen, B. A. (2004). The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nature Review Cancer*, 4 (6), 423-36.

Khan, N., Afaq, F., Saleem, M., Ahmad, N. et Mukhtar, H. (2006). Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Research*, 66 (5), 2500-5.

Kim, C. J., Isono, T., Tambe, Y., Chano, T., Okabe, H., Okada, Y. et Inoue, H. (2008). Role of alternative splicing of periostin in human bladder carcinogenesis. *International Journal of Oncology*, 32 (1), 161-9.

Kim, H.S., Quon, M.J. et Kim, J.A. (2014). New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox Biology*, 10 (2), 187-95.

Kim, J. E., Jeong, H. W., Nam, J. O., Lee, B. H., Choi, J. Y., Park, R. W., Park, J. Y. et Kim, I. S. (2002). Identification of motifs in the fasciclin domains of the transforming growth factor-beta-induced matrix protein betaig-h3 that interact with the $\alpha_v\beta_5$ integrin. *Biochemical Journal*, 277 (48), 46159-65.

Kudo, A. (2011). Periostin in fibrillogenesis for tissue regeneration: periostin actions inside and outside the cell. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68 (19), 3201-7.

Kudo, Y., Iizuka, S., Yoshida, M., Nguyen, P.T., Siriwardena, S.B., Tsunematsu, T.,

Ohbayashi, M., Ando, T., Hatakeyama, D., Shibata, T., Koizumi, K., Maeda, M., Ishimaru, N., Ogawa, I. et Takata, T. (2012). Periostin directly and indirectly promotes tumor lymphangiogenesis of head and neck cancer. *PLoS One*, 7 (8), 44488.

Kudo, Y., Ogawa, I., Kitajima, S., Kitagawa, M., Kawai, H., Gaffney, P. M., Miyauchi, M. et Takata, T. (2006). Periostin promotes invasion and anchorage-independent growth in the metastatic process of head and neck cancer. *Cancer Research*, 66(14), 6928-35.

Kudo, Y., Siriwardena, B. S., Hatano, H., Ogawa, I. et Takata, T. (2007). Periostin: novel diagnostic and therapeutic target for cancer. *Journal of Histology and Histopathology*, 22 (10), 1167-74.

Kuper H., Adami H.O. et Trichopoulos D. (2000). Infections as a major preventable cause of human cancer. *Journal of Internal Medicine*, 248, 171-83.

Krūzynska-Frejtag, A., Wang, J., Maeda, M., Rogers, R., Krug, E., Hoffman, S., Markwald, R. R. et Conway, S. J. (2004). Periostin is expressed within the developing teeth at the sites of epithelial-mesenchymal interaction. *Developmental Dynamics*, 229 (4), 857-68.

Lamy, S., Gingra, D. et Béliveau, R. (2002). Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation. *Cancer Research*, 62 (2), 381-85.

Lee, M.J., Wang, Z.Y., Li, H., Chen, L., Sun, Y., Gobbo, S., Balentine, D.A. et Yang, C.S. (1995). Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 4, 393-9.

Li, J. S., Sun, G. W., Wei, X. Y. et Tang, W. H. (2007). Expression of periostin and its clinicopathological relevance in gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 13 (39), 5261-6.

Li, M., Mukasa, A., del-Mar Inda, M., Zhang, J., Chin, L., Cavenee, W. et Furnari, F. (2011). Guanylate binding protein 1 is a novel effector of EGFR-driven invasion in glioblastoma. *The Journal of Experimental Medicine*, 208 (13), 2657-73.

Li, P., Oparil, S., Feng, W. et Chen, Y. F. (2004). Hypoxia-responsive growth factors upregulate periostin and osteopontin expression via distinct signaling pathways in rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Journal of Applied Physiology*, 97 (4), 1550-8.

Lindsley, A., Li, W., Wang, J., Maeda, N., Rogers, R. et Conway, S. J. (2005). Comparison of the four mouse fasciclin containing genes expression patterns during valvulo septal morphogenesis. *Gene Expression Pattern*, 5 (5), 593-600.

Lindsley, A., Snider, P., Zhou, H., Rogers, R., Wang, J., Olaopa, M., Kruzynska-Freitag, A., Koushik, S. V., Lilly, B., Burch, J. B., Firulli, A. B. et Conway, S. J. (2007). Identification and characterization of a novel Schwann and outflow tract endocardial cushion lineage-restricted periostin enhancer. *Developmental Biology*, 307 (2), 340-55.

Litvin, J., Selim, A.H., Montgomery, M.O., Lehmann, K., Rico, M.C., Devlin, H., Bednarik, D.P. et Safadi, FF. (2004). Expression and function of periostin-isoforms in bone. *Journal of Cellular Biochemistry*, 92 (5), 1044-61.

Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestel O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., Schethauer, B.W. et Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours

of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, 114: 97-109.

Ma, D., Lu, H., Xu, L., Xu, X., et Xiao, W. (2009). Mechanical loading promotes Lewis lung cancer cell growth through periostin. *In Vitro Cellular Developmental Biology Animal*, 45 (8), 467-72.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. et Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal Clinical Nutrition*, 79 (5), 727- 47.

Meeran, S.M., Patel, S.N., Chan, T.H et Tollefsbol, T.O. (2011). A novel prodrug of epigallocatechin-3- gallate: differential epigenetic htert repression in human breast cancer cells. *Cancer Prevention Research*, 4 (8), 1243-54.

Mikheev, A. M., Mikheeva, S. A., Trister, A. D., Tokita, M. J., Emerson, S. N., Parada, C. A., Born, D. E., Carnemolla, B., Frankel, S., Kim, D.H., Oxford, R.G., Kosai, Y., Tozer-Fink, K. R., Manning, T.C., Silber, J. R et Rostomily, R.C. (2015). Periostin is a novel therapeutic target that predicts and regulates glioma malignancy. *Neuro-Oncology*, 17 (3), 372-82

Mittal, K., Ebos, J. et Rini, B. (2014). Angiogenesis and the tumor microenvironment: vascular endothelial growth factor and beyond. *Seminars in Oncology*, 41(2), 235-51.

Muir, C. S., Nectoux, J. et Staszewski, J. (1991). The epidemiology of prostate cancer: Geographical distribution and time-trends. *Acta Oncologica*, 30 (2): 133-40.

Munoz-Chapuli, R. (2011). Evolution of angiogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*, 55(4-5), 345-51.

Nakazawa, T., Nakajima, A., Seki, N., Okawa, A., Kato, M., Moriya, H., Amizuka, N., Einhorn, T. A. et Yamazaki, M. (2004). Gene expression of periostin in the early stage of fracture healing detected by cDNA microarray analysis. *Journal of Orthopaedic Research*, 22 (3), 520-5.

Nam, S., Smith, D. M., et Dou, Q. P. (2001). Ester bond-containing tea polyphenols potently. Inhibit proteasome activity in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 13322-30.

Norris, R.A., Damon, B., Mironov, V., Kasyanov, V., Ramamurthi, A., Moreno-Rodriguez, R., Trusk, T., Potts, J.D., Goodwin, R.L., Davis, J., Hoffman, S., Wen X, Sugi Y, Kern CB, Mjaatvedt CH, Turner DK, Oka T, Conway SJ, Molkentin, J.D., Forgacs, G. et Markwald, R.R. (2007). Periostin regulates collagen fibrillogenesis and the biomechanical properties of connective tissues. *Journal of Cellular Biochemistry*, 101(3), 695-711.

Norris, R. A., Borg, T. K., Butcher, J. T., Baudino, T. A., Banerjee, I. et Markwald, R. R. (2008). Neonatal and adult cardiovascular pathophysiological remodeling and repair: developmental role of periostin. *Annals of the New York Academy of sciences*, 1123, 30-40.

Okabe, S., Suganuma, M., Hayashi, M., Sueoka, E., Komori A. et Fujiki, H. (1997). Mechanisms of growth inhibition of human lung cancer cell line, PC-9, by tea polyphenols. *Japanese Journal of Cancer Research*, 88, 639-43.

Oku, E., Kanaji, T., Takata, Y., Oshima, K., Seki, R., Morishige, S., Imamura, R., Ohtsubo, K., Hashiguchi, M., Osaki, K., Yakushiji, K., Yoshimoto, K., Ogata, H., Hamada, H., Izuhara, K., Sata, M. et Okamura, T. (2008). Periostin and bone marrow

fibrosis. *International Journal of Hematology*, 88 (1), 57-63.

Oshima, A., Tanabe, H., Yan, T., Lowe, G. N., Glackin, C. A. et Kudo, A. (2002). A novel mechanism for the regulation of osteoblast differentiation: transcription of periostin, a member of the fasciclin I family, is regulated by the bHLH transcription factor, twist. *Journal of Cellular Biochemistry*, 86 (4), 792-804.

Organisation Mondiale de la Santé. Centre des médias – Cancer. Récupéré le 15/12/2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/>

Quaresima, B., Romeo, F., Faniello, M. C., Di Sanzo, M., Liu, C. G., Lavecchia, A., Taccioli, C., Gaudio, E., Baudi, F., Trapasso, F., Croce, C. M., Cuda, G. et Costanzo, F. (2008). BRCA1 5083del19 mutant allele selectively upregulates periostin expression in vitro and in vivo. *Clinical Cancer Research*, 14 (21), 6797-803.

Qiu, F., Shi, C. H., Zheng, J. et Liu, Y. B. (2013). Periostin mediates the increased pro-angiogenic activity of gastric cancer cells under hypoxic conditions. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 27(7), 364-9.

Ramos, S. (2007). Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18 (7), 427-42.

Rios, H., Koushik, S. V., Wang, H., Wang, J., Zhou, H. M., Lindsley, A., Rogers, R., Chen, Z., Maeda, M., Kruzynska-Frejtag, A., Feng, J. Q. et Conway S. J. (2005). Periostin null mice exhibit dwarfism, incisor enamel defects, and an early-onset periodontal disease-like phenotype. *Molecular and Cellular Biology*, 25(24), 11131-44.

Roy, S., Patel, D., Khanna, S., Gordillo, G. M., Biswas, S., Friedman, A. et Sen, C. K. (2007). Transcriptome-wide analysis of blood vessels laser captured from human

skin and chronic wound-edge tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (36), 14472-7.

Ruan, K., Bao, S. et Ouyang, G. (2009). The multifaceted role of periostin in tumorigenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(14), 2219-2230.

Ruidavets, J.B., Teissedre, P.L., Ferrières J., Carando, S. Bougard, G. et Cabanis, J.C. (2000). Catechin in the Mediterranean diet: Vegetable, fruit or wine ? *Atherosclerosis*, 153, 107-117.

Sasaki, H., Sato, Y., Kondo, S., Fukai, I., Kiriyaama, M., Yamakawa, Y. et Fuji, Y. (2002). Expression of the periostin mRNA level in neuroblastoma. *Journal of Pediatric Surgery*, 37 (9), 1293-7.

Sen, T., Moulik, S., Dutta, A., Choudhury, P. R., Banerji, A., Das, S., Roy, M. et Chatterjee, A. (2009). Multifunctional effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in downregulation of gelatinase-A (MMP-2) in human breast cancer cell line MCF-7. *Life Science*, 84 (7-8), 194-204.

Shao, R., Bao, S., Bai, X., Blanchette, C., Anderson, R. M., Dang, T., Gishizky, M. L., Marks, J. R. et Wang, X. F. (2004). Acquired expression of periostin by human breast cancers promotes tumor angiogenesis through upregulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 expression. *Molecular and Cellular Biology*, 24 (9), 3992-4003.

Shimazaki, M., Nakamura, K., Kii, I., Kashima, T., Amizuka, N., Li, M., Saito, M., Fukuda, K., Nishiyama, T., Kitajima, S., Saga, Y., Fukayama, M., Sata, M. et Kudo, A. (2008). Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction. *The Journal of Experimental Medicine*, 205 (2), 295-303.

Sirica, A. E., Almenara, J. A. et Li, C. (2014). Periostin in intrahepatic cholangiocarcinoma: Pathobiological insights and clinical implications. *Experimental and Molecular Pathology*, 97(3), 515-524.

Société Canadienne du Cancer. Rapport récupéré le 20/12/2014.
<http://www.cancer.ca/~media/cancer.ca/CW/cancer%20information/cancer%20101/Canadian%20cancer%20statistics/canadian-cancer-statistics-2013-FR.pdf>

Soltermann, A., Tischler, V., Arbogast, S., Braun, J., Probst-Hensch, N., Weder, W., Moch, H. et Kristiansen, G. (2008). Prognostic significance of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition protein expression in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 14 (22), 7430-7.

Stamenkovic, I. (2003). Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *The Journal of Pathology*, 200(4), 448-64.

Suganuma, M., Okabe, S., Oniyama, M., Tada, Y., Ito, H. et Fujiki, H. (1998). Wide distribution of [3H](-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue. *Carcinogenesis*, 19 (10), 1771-1776.

Sugiura, T., Takamatsu, H., Kudo, A. et Amann, E. (1995). Expression and characterization of murine osteoblast-specific factor 2 (OSF-2) in a baculovirus expression system. *Protein Expression and Purification*, 6 (3), 305-11.

Surh, Y. J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*, 3 (10), 768-80.

Tachibana, H. (2011). Green tea polyphenol sensing. *Proceedings of the Japan Academy Series B Physical and Biological Sciences*, 87(3), 66-80.

Tai, I. T., Dai, M. et Chen, L. B. (2005). Periostin induction in tumor cell line explants and inhibition of in vitro cell growth by anti-periostin antibodies. *Carcinogenesis*, 26 (5), 908-15.

Takanami, I., Abiko, T. et Koizumi, S. (2008). Expression of periostin in patients with non-small cell lung cancer: correlation with angiogenesis and lymphangiogenesis. *The International Journal of Biological Markers*, 23 (3), 182-86.

Takayama, G., Arima, K., Kanaji, T., Toda, S., Tanaka, H., Shoji, S., McKenzie, A. N., Nagai, H., Hotokebuchi, T. et Izuhara, K. (2006). Periostin: a novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118 (1), 98-104.

Takeshita, S., Kikuno, R., Tezuka, K., et Amann, E. (1993). Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochemical Journal*, 294 (1), 271-8.

Tayebjee, M. H., MacFadyen R. J. et Lip, G. Y. (2003). Extracellular matrix biology: a new frontier in linking the pathology and therapy of hypertension? *Journal Hypertension*, 21(12), 2211-8.

Tomasetti, C. et Vogelstein, B. (2015). Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science*, 347(6217):78-81.

Venkitaraman A.R. (2002). Cancer Susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*. 108 (2), 171-82.

Wang, C. C., Chen J. J., et Yang, P. C. (2006). Multifunctional transcription factor YY1: a therapeutic target in human cancer? *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 10 (2), 253-66.

Watanabe, T., Yasue, A., Fujihara, S., et Tanaka, E. (2012). PERIOSTIN regulates MMP-2 expression via the $\alpha_v\beta_3$ integrin/ERK pathway in human periodontal ligament cells. *Archives of Oral Biology*, 57, 52-9.

Weinberg, R. A. (2007). *The biology of cancer*: Garland Science, Taylor & Francis Group, New York.

Wilde, J., Yokozeki, M., Terai, K., Kudo, A. et Moriyama, K. (2003). The divergent expression of periostin mRNA in the periodontal ligament during experimental tooth movement. *Cell and Tissue Research*, 312 (3), 345-51.

World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*. Washington DC: AICR, 2007. Récupéré le 20/12/2014. http://www.dietandcancerreport.org/cancer_resource_center/downloads/Second_Expert_Report_full.pdf

Yan, W. et Shao, R. (2006). Transduction of a mesenchyme-specific gene periostin into 293T cells induces cell invasive activity through epithelial-mesenchymal transformation. *The Journal of Biological Chemistry*, 281 (28), 19700-8.

Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J. et Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407 (6801), 242-8.

Yang, C.S., Wang, X., Lu, G. et Picinich, S.C. (2009). Cancer prevention by tea: Animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nature Reviews Cancer*, 9(6), 429-39.

Yang, Y., Jiao, L., Hou, J., Xu, C., Wang, L., Yu, Y., Li, Y., Yang, C., Wang, X. et Sun, Y. (2013). Dishevelled-2 silencing reduces androgen-dependent prostate tumor cell proliferation and migration and expression of Wnt-3a and matrix metalloproteinases. *Molecular Biology Reports*, 40(7), 4241-50.

Yilmaz, M., Christofori, G. et Lehenbre, F. (2007). Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis. *Trends in Molecular Medicine*, 13 (12), 535-41.

Yin, D., Ogawa, S., Kawamata, N., Leiter, A., Ham, M., Li, D., Doan, N. B., Said, J. W., Black, K. L. et Phillip Koeffler, H. (2013). miR-34a functions as a tumor suppressor modulating EGFR in glioblastoma multiforme. *Oncogene*, 32, 1155-63.

Zaveri, NT. (2006). Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Science*, 78 (18), 2073-80.

Zeng L., Holly, J.M. et Perks, C. M. (2014). Effects of physiological levels of the green tea extract epigallocatechin-3-gallate on breast cancer cells. *Frontiers in endocrinology*, 5 (61), 1-10.

Zhang, Z., Nie, F., Chen, X., Qin, Z., Kang, C., Chen, B., Ma, J., Pan, B. et Ma, Y. (2015). Upregulated periostin promotes angiogenesis in keloids through activation of

the ERK 1/2 and focal adhesion kinase pathways, as well as the upregulated expression of VEGF and angiopoietin-1. *Molecular Medecine Reports*, 11 (2), 857-64.

Zhu, S., Barbe, M. F., Amin, N., Rani, S., Popoff, S. N., Safadi, F. F. et Litvin, J. (2008). Immunolocalization of Periostin-like factor and Periostin during embryogenesis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 56(4), 329-45.

Zhu, S., Barbe, M. F., Liu, C., Hadjiargyrou, M., Popoff, S. N., Rani, S., Safadi, F. F. et Litvin, J. (2009). Periostin-likefactor in osteogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 218 (3), 584-92.